

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Brno, 2017

Bc. Denisa Valasová



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**ANALÝZA BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK V OLEJI  
Z MERUŇKOVÝCH JADER.**

ANALYSIS OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN APRICOT OIL

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**Bc. Denisa Valasová**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. Andrea Hároniková,  
Ph.D.**

**BRNO 2017**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP0997/2016  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Bc. Denisa Valasová**  
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.**  
Akademický rok: 2016/17

### Název diplomové práce:

Analýza biologicky aktivních látek v oleji z meruňkových jader.

### Zadání diplomové práce:

V rámci práce budou řešeny následující dílčí úkoly:

1. charakterizace oleje z meruňkových jader různého původu
2. analýza vybraných aktivních složek obsažených meruňkovém oleji
3. možnosti využití meruňkového oleje v kosmetice a potravinářství

### Termín odevzdání diplomové práce: 5.5.2017

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. Denisa Valasová  
student(ka)

-----  
Ing. Andrea Hároniková, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2017

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je zaměřena na analýzu biologicky aktivních látek v oleji z meruňkových jader. Meruňkový olej se v poslední době začal hojně využívat v kosmetickém průmyslu, zejména jako masážní olej nebo součást hydratačních krémů. Cílem této práce je charakterizace a posouzení kvality meruňkového oleje, stanovení obsahu vybraných aktivních složek, prostřednictvím řady analytických metod, a následné využití tohoto oleje právě v kosmetice a potravinářství. Práce je založena na porovnání kvality čistého meruňkového oleje a oleje po procesu fermentace. Bylo zjištěno, že olej z meruňkových jader skutečně obsahuje velké množství nenasycených mastných kyselin. Také byla potvrzena výborná antioxidační aktivita meruňkových jader, zejména těch po fermentaci. Mimo antioxidační aktivitu, obsahují vzorky po fermentaci poměrně velké množství tokoferolu. Vitamin E je důležitý pro vychytávání volných radikálů v lipidových dvojvrstvách, tudíž pro zpomalení stárnutí, ochraně membrány a také k prevenci možných kardiovaskulárních a onkologických chorob. Dále byly v diplomové práci potvrzeny nejen hydratační účinky krémů s meruňkovým olejem, ale také jejich schopnost zábrany transepidermální ztráty vody z epidermis. Krémy byly testovány na pěti probandech, ve věku 23–24 let, s různým typem pleti. Po aplikaci krémů na jejich pokožku se výrazně zlepšily tyto vlastnosti, pleť byla regenerovaná a hydratovaná po dobu 24 hodin od ošetření.

## **ABSTRACT**

The Master's thesis is focused on the analysis of biologically active substances in apricot kernel oil. Apricot oil has recently begun to be widely used in the cosmetics industry, particularly as a part of massage oils or as part of moisturizing creams. The aim of this thesis is to characterize and assess the quality of apricot oil, determination of the content of selected active ingredients, through a series of analytical methods, and subsequent use of this oil in cosmetics and food industry. The thesis is based on the comparison of the quality of pure apricot oil and the oil after the fermentation process. It has been found that apricot kernel oil actually contains large amounts of unsaturated fatty acids. The excellent antioxidant activity of apricot kernels was proven too, especially those after fermentation. In addition to antioxidant activity, the samples contain a relatively large amount of tocopherol after the fermentation. Tocopherol is important for the uptake of free radicals in lipid bilayers, thus slowing down aging, protect the membranes and also prevent from possible cardiovascular and oncological diseases. Furthermore, in the Master's thesis there were confirmed not only the hydration effects of creams with apricot oil, but also their ability of inhibit transepidermal loss of water from the epidermis. Creams were tested on five probands, aged 23–24, with different skin types. After the application of creams to their skin, these properties greatly improved, the skin has been regenerated and hydrated for 24 hours after the treatment.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

meruňkový olej, antioxidační aktivita, tokoferol, hydratační účinky

## **KEY WORDS**

apricot kernel oil, antioxidant activity, tocopherol, moisturizing effects

VALASOVÁ, D. *Analýza biologicky aktivních látek v oleji z meruňkových jader*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2017. 67 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Andrea Hároniková, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

### **Poděkování:**

*Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Andree Háronikové, PhD. za vedení při psaní a zpracování práce, a také za cenné rady a připomínky. Také bych chtěla moc poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu.*

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Meruňkový olej.....	8
2.1.1	Historie původu.....	8
2.1.2	Historie využití.....	8
2.1.3	Charakteristika .....	8
2.1.4	Využití .....	10
2.1.5	Výroba .....	10
2.2	Biologicky aktivní látky v meruňkovém oleji .....	12
2.2.1	Lipidy .....	13
2.2.2	Sacharidy .....	13
2.2.3	Polysacharidy.....	14
2.2.4	Bílkoviny .....	14
2.2.5	Antioxidanty .....	15
2.2.6	Vybrané antioxidační látky.....	17
2.3	Metody analýzy meruňkového oleje, jader a pokrutiny .....	19
2.3.1	Izolace a stanovení celkových lipidů .....	19
2.3.2	Stanovení funkčních skupin lipidů .....	20
2.3.3	Stanovení mastných kyselin .....	20
2.3.4	Stanovení sacharidů.....	21
2.3.5	Stanovení nevyužitelných polysacharidů-vlákniny.....	22
2.3.6	Stanovení bílkovin .....	22
2.3.7	Stanovení metodou HPLC – kyselina askorbová, tokoferol.....	23
2.3.8	Stanovení vody a sušiny .....	24
2.4	Metody stanovení hydratace a transepidermální ztráty vody .....	24
2.5	Testy genotoxicity.....	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	28
3.1	Použité přístroje, pomůcky a chemikálie .....	28
3.2	Příprava vzorků pro analýzu.....	29
3.3	Izolace lipidů-Folchova metoda.....	32
3.4	Stanovení tukových čísel.....	32
3.5	Stanovení methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií .....	33
3.6	Stanovení celkových sacharidů dle Duboise .....	33
3.7	Stanovení vlákniny dle Henneberga a Stohmana .....	34

3.8	Stanovení obsahu bílkovin dle Kjeldahla .....	34
3.9	Stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC .....	35
3.10	Stanovení celkových polyfenolů .....	35
3.11	Stanovení celkových flavonoidů .....	36
3.12	Stanovení vitamínu C (kyseliny askorbové) metodou HPLC .....	36
3.13	Stanovení vitamínu E (tokoferolu) metodou HPLC .....	36
3.14	Stanovení sušiny sušením .....	37
3.15	Příprava a účinky krémů z meruňkového oleje .....	37
3.16	Testování Genotoxicity-SOS Chromotest .....	40
4	VÝSLEDKY A DISKUZE .....	41
4.1	Izolace lipidů-Folchova metoda .....	41
4.2	Stanovení tukových čísel .....	41
4.3	Obsah mastných kyselin .....	43
4.4	Obsah celkových sacharidů .....	44
4.5	Obsah vlákniny .....	45
4.6	Obsah bílkovin .....	46
4.7	Antioxidační aktivity .....	47
4.8	Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů .....	48
4.9	Obsah kyseliny askorbové a tokoferolu .....	50
4.10	Obsah sušiny .....	52
4.11	Vyhodnocení účinků krémů z meruňkového oleje .....	53
4.12	SOS Chromotest .....	56
5	ZÁVĚR .....	58
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	60
7	SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK .....	65
8	PŘÍLOHY .....	66

# 1 ÚVOD

Meruňka obecná (*Prunus armeniaca*) je strom řadící se do rodu slivoní, kde patří například také broskve, třešně nebo švestky. Kořeny jejího původu sahají do Číny, odkud se přes Arménii a Evropu dostala až do Českých zemí.

Na blahodárné účinky meruňkových plodů, resp. jejich jader, přišli již v historii, kde se hojně využívaly zejména v čínské medicíně. Používali ho především jako přírodní alternativu léku proti rakovině, dále k léčbě dýchacích problémů-astmatu a bronchitidy, vředů, otoků a také k regeneraci pokožky a vlasů. Časem se ukázalo, že v léčbě rakoviny nejsou meruňková jádra prospěšná, a naopak některé studie prokázaly jejich nebezpečnost. Jádra obsahují látku zvanou amygdalin, která se v lidském organismu štěpí za vzniku kyanidu. Při požití většího množství meruňkových jader tedy může nastat otrava tímto jedem.

Lisováním jader za studena se získává panenský meruňkový olej, který má široké uplatnění, jak v potravinářství, tak v kosmetice. Je to zejména díky množství mastných kyselin a vitamínů, které obsahuje. Jsou v něm poměrně hojně zastoupeny kyselina olejová, linolová, palmitová a další už minoritně zastoupené mastné kyseliny. V případě kyseliny olejové a linolové se jedná o nenasycené mastné kyseliny, které posilují kardiovaskulární systém, centrální nervovou soustavu apod., proto jsou velice důležité pro lidský organismus. Vitamíny, kyselina askorbová a tokoferol, zde plní hlavně funkci antioxidačních látek. Oba tyto vitamíny patří do skupiny esenciálních látek, tudíž je nutné přijímat je z potravy. Tokoferol hraje v lidském organismu klíčovou roli, díky tomu, že vychytává volné radikály v lipidových dvojvrstvách, tím zpomaluje proces stárnutí a předchází poškození membrán. V konečném stádiu tak může předcházet možným onkologickým a kardiovaskulárním chorobám.

V dnešní době se v potravinářství nevyužívá pouze samotný meruňkový olej, ale také jádra, z kterých je vyroben. Jsou vhodné k přípravě různých pokrmů i k jejich dochucování. V kosmetice nachází uplatnění především jako složka hydratačních krémů, které jsou vhodné pro jakýkoliv typ pokožky, jelikož se vyznačují výbornými regeneračními a hydratačními účinky. Olej regeneruje pokožku například po opalování, ale také zamezuje podráždění suché a citlivé pokožky, díky rychlé obnově ochranného filmu. Je výborný také k léčbě kožních onemocnění. Snižuje napětí pokožky při ekzémech, odstraňuje akné a je užitečný i při léčbě lupénky. Čistý meruňkový olej se používá také jako masážní olej, zejména je vhodný pro pokožku kojenců, díky své jemnosti, nedráždivé vůni a dobré vstřebatelnosti, jelikož nezanechává na kůži mastný povlak.

V této diplomové práci je komplexně analyzováno chemické složení oleje z meruňkových jader za účelem potvrzení jeho blahodárných účinků na lidský organismus. Práce je zaměřena na kosmetické využití tohoto oleje, přípravu krémů a následné stanovení jejich hydratačních účinků.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Meruňkový olej

#### 2.1.1 Historie původu

Původ meruněk není doposud zcela neobjasněn. Dle jejich latinského botanického názvu *Prunus armeniaca* (český botanický název: meruňka obecná) se mnozí domnívají, že je jejich původ právě v Arménii, kde se pěstuje již od středověku. Podle dalších dochovaných informací se uvádí vznik názvu na Dálném východě, a to s největší pravděpodobností v Himalájích a severní Číně. Spekuluje se také o prvním pěstování těchto plodů v Indii asi 3000 let před naším letopočtem. Také v Persii se meruňky pěstují už od starověku a hrály významnou roli na perských obchodních cestách. Do Říma se dostaly díky Římskému generálovi Lucullusovi, který je zde přivezl z Arménie. Přínos meruněk do Řecka je přičítán Alexandru Velikému. V 17. století přinesli toto ovoce angličtí osadníci také do anglických kolonií v Novém světě. Do Ameriky se meruňky dostaly prostřednictvím španělských misionářů a dnes se pěstují především v Kalifornii, Washingtonu a Utahu. Meruňky jsou pěstovány i v Austrálii, zejména v její jižní části. Postupem času se pěstování meruněk rozšířilo do všech částí světa s vyhovujícími klimatickými podmínkami. V České republice tomu vyhovují vinorodé kraje, zejména na jižní Moravě, kde se pěstuje Velkopavlovická odrůda, nejrozšířenější u nás [1], [2].

#### 2.1.2 Historie využití

Meruňkový olej, který se vyrábí lisováním meruňkových jader za studena, se využíval již v roce 502 nl jako přírodní alternativa léku proti tvorbě nádorů. V 17. století se jádra meruněk využívala v Anglii při léčbě vředů, otoků a nádorů. Tento olej má dalekosahající kořeny především do čínské medicíny. V Číně se meruňková jádra předepisují dodnes zejména k léčbě dýchacích problémů jako je astma, bronchitida a rozedma plic. Své uplatnění našla také při léčení kašle, zácpy a pro regeneraci pokožky a vlasů.

V roce 1920 byla meruňková jádra uznána v mnoha státech jako preventivní a maligní inhibitor růstu rakovinných buněk. Úspěšnost meruňkového oleje, resp. jader, jako léku proti rakovině, díky látce zvané amygdalin, podpořil i americký biochemik Ernst Theodore Krebs. Právě Krebs jako první prezentoval amygdalin pod nesprávným označením vitamín B17 a domníval se, že společně s dietou a vitamíny, může tato látka zabránit rakovinnému bujení. Některé studie provedené ve Spojených státech v letech 1970–1980 prokázaly neúspěšnost amygdalinu při „zabíjení“ rakovinných buněk. Jiné studie dokazují rozklad amygdalinu v těle, po odštěpení glukózy, za vzniku kyanidu, vysoce toxické látky. Po požití velkého množství meruňkových jader může nastat otrava tímto jedem, která může vést až ke smrti. Skutečnost, že je meruňkový olej, resp. meruňková jádra, prospěšný při léčbě rakoviny je tedy neustále potvrzována a vyvracena, a tudíž ji nemůžeme stoprocentně potvrdit [2], [3].

#### 2.1.3 Charakteristika

Jak již bylo zmíněno výše, meruňkový olej je produkován jádrem meruňky obecné, její taxonomie je uvedena v Tabulka 1.

Tabulka 1: Taxonomie meruňky obecné [4]

Taxonomické zařazení	Vědecká kategorie	Latinský název
Říše	rostliny	<i>Plantae</i>
Podříše	cévnaté rostliny	<i>Tracheobionta</i>
Oddělení	krytosemenné	<i>Magnoliophyta</i>
Třída	vyšší dvouděložné	<i>Rosopsida</i>
Řád	růžotvaré	<i>Rosales</i>
Čeleď	růžovité	<i>Rosaceae</i>
Rod	slivoň	<i>Prunus</i>

Meruňka začíná kvést velmi brzy z jara, a proto nemůže být pěstována v lokalitách s podzimními a jarními mrazy. Tento strom dosahuje výšky zhruba 6 metrů a jeho květy jsou bílé, tónované do červena nebo hněda. Meruňka dozrává většinou uprostřed léta a její plody jsou peckovice s oranžovým oplodím, viz Obr. 1 [1]. Meruňková jádra se dělí na sladká a hořká. Hořká jádra se získávají z planých, divokých meruněk a obsahují poměrně velké množství HCN, jak již bylo zmíněno výše. Aby bylo možné z těchto jader vyrábět olej, musí dojít k detoxikaci kyanovodíku. Bylo zjištěno, že nejlépe toho dosáhneme máčením jader v 10% roztoku  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , kdy následně dojde ke vzniku thiokyanátu, který je rozpustný ve vodě [5]. Sladká jádra jsou většinou spotřebována bez zpracování jako zdroj bílkovin, vlákniny a oleje. Často bývají tato jádra používána jako levné náhražky mandlí např. v pečivu. Olej vyrobený z obou typů jader má žlutou barvu téměř bez vůně a chuti [6].



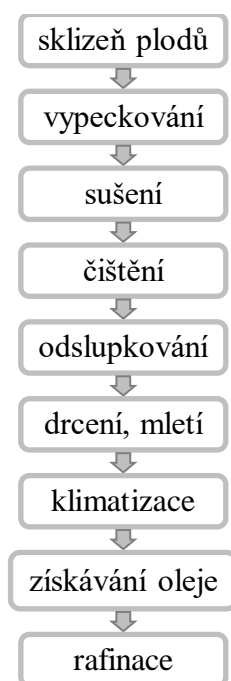
Obr. 1: Vývojové fáze meruňky obecné (*Prunus armeniaca*) [7]

### 2.1.4 Využití

Díky svým účinkům má meruňkový olej široké uplatnění v potravinářství i kosmetice. V potravinářství se využívá zejména na pečení, smažení, ale i k dochucování různých jídel. V kosmetickém průmyslu se tento olej používá především jako složka hydratačních krémů, vhodných k ošetření suché a citlivé pokožky, zejména kvůli vysokému obsahu mastných kyselin a vitamínů, které obsahuje. Důležitou složkou je vitamín E, který zklidňuje pokožku a zpomaluje proces stárnutí. Olej má také protizánětlivé účinky a využívá se k léčbě akné, ekzémů a lupénky. V kosmetice se může vyskytovat také jako složka toaletních mýdel a balzámů. Olej se sám o sobě velice dobře roztírá, rychle vstřebává do pokožky, působí proti bolesti, zánětu a nemá dráždivý účinek, proto je ideální i jako masážní olej jak pro dospělé, tak pro děti a kojence. Meruňkový olej si však zachoval i své historické využití v medicínských aplikacích. Posiluje imunitní systém a používá se k léčbě nachlazení a chřipky, kašle [8], [9].

### 2.1.5 Výroba

Výroba meruňkového oleje zahrnuje také úpravy sklizených plodů meruňky, viz Obr. 2.



Obr. 2: Postup výroby meruňkového oleje [10], [11]

Jak můžeme vidět na Obr. 2, po úpravě sklizených plodů, následuje izolace oleje lisováním, kdy pomocí tlaku dochází k mechanickému oddělení oleje z rostlinných pletiv, nebo extrakcí, u které dochází k extrakci oleje z rostlinných pletiv organickým rozpouštědlem, nejčastěji hexanem. Často dochází i ke kombinaci obou postupů [10].

#### **Úprava semen**

Jak již bylo zmíněno, doba zrání meruněk je odlišná pro každou odrůdu, probíhá přibližně od začátku června po konec srpna. Sklizeň zralých plodů je nutné hlídat, protože podléhají rychlé zkáze. Po sklizni následuje vyloupávání pecek buď manuálně, nebo mechanicky, pomocí dvou opačně otočených válců, kdy dochází ke střídání střížné a drtící síly [12].

Následuje proces sušení, který je při výrobě velice důležitý. Zvýšený obsah vody může způsobit zapaření skladovaných semen, čímž dojde k jejich znehodnocení. Sušení se může provádět pomocí sušárny (bubnové, vakuové) nebo se pecky nechají vysušit na vzduchu. Celý proces tedy probíhá poměrně při nízkých teplotách, aby nedošlo ke snížení kvality oleje.

Z vysušených semen je nutné odstranit nečistoty (např. hlínu, písek, stébla, aj.), aby nedošlo ke znehodnocení pokrutin. Čištění zajišťují nejčastěji sítové čističky, které mohou mít např. vibrační nebo rotační charakter, a dochází k oddělování na základě velikosti semen. Dále se může použít také aspirátor, který čistí semena pomocí proudu vzduchu [6].

Před drcením je nutné jádra tzv. odslupkovat od tvrdé skořápky, která obsahuje nestravitelné látky, a také látky zhoršující kvalitu výsledného produktu, oleje. Odstranění slupky zajišťuje větší výtěžek meruňkového oleje. Tento proces se provádí mechanicky, prostřednictvím bubnového odslupkovacího stroje nebo rotačního louskáčku [13].

K zajištění jednodušší izolace oleje je potřeba podrobit jádra drcení a mletí. Tato fáze je při výrobě oleje nezbytná. Dochází při ní k rozrušení struktur semen, částečnému narušení pletiv a buněk, i k mnohonásobnému zvětšení povrchu, což usnadní vytékání oleje. Proces mletí se provádí na mlecích stolicích s horizontálním, vertikálním nebo diagonálním uspořádáním rýhovaných válců, které se otáčejí odlišnou rychlostí v opačném směru. Dochází k působení tlakových, tahových a střížných sil, tím se překonají vazné síly v namáhaném semeni, dojde k částečnému mechanickému narušení pletiv, případně celých buněk.

Poslední úpravou jader před získáním samotného oleje je klimatizace neboli kondicionace semen. Tento proces kombinuje působení fyzikálně-chemické a biochemické pochody na namleté semeno. Klimatizace probíhá ve dvou fázích. Nejprve je rozemleté semeno vystaveno účinku syté páry za zvýšené teploty (85–110) °C, kdy dojde k hydrofilizaci přítomných polysacharidů a bílkovin. Nastává praskání buněčných stěn v důsledku vzniku hydrofilních gelů a také ke snížení viskozity oleje ohřevem, materiál nabývá viskoplastického chování. Obsah vody stoupne zhruba na (12–15) %. Ve druhé fázi se provádí sušení nepřímým ohřevem. Musí dojít k úpravě koncentrace vody takovým způsobem, aby materiál nabyl optimální mechanické vlastnosti. Proces klimatizace má negativní vliv na barvu oleje, zvýšenou koncentraci fosfolipidů v oleji a také může dojít k oxidaci oleje a k částečné denaturaci bílkovin. Na tuto úpravu se využívají tzv. vertikální nahřívací pánve o pěti až sedmi patrech. V horních patrech se zvyšuje obsah vlhkosti přímou parou, ve spodních pak dochází k sušení za stálého míchání. Z těchto pánví vystupuje materiál přímo do lisu [11].

### ***Získávání oleje***

Při lisování nastává působením tlakových sil separace kapalně fáze z rostlinných pletiv, buněk čili pevné fáze. Vylisovaná kapalná fáze odtéká z ced'áku lisu a v prostoru nad ced'ákem zůstává odpad po lisování-výlisky, pokrutiny. Ced'ák plní současně úlohu filtru. V dnešní době se téměř výhradně používají kontinuální šnekové lisy. Aby měla metoda lisování význam, upotřebuje se pro olejninu s vyšším obsahem tuku, minimální hranice je (25–30) %. U výroby meruňkového oleje se užívá lisování za studena, aby nedocházelo k nežádoucím změnám v přírodních hodnotách oleje, významné vitamíny i minerální látky jsou při tomto procesu zachovány. Namletá semena jsou umístěna do šnekového lisu a postupným otáčením nastává uvolňování a samovolné vytékání surového oleje. Při tomto postupu musí být pečlivě sledována teplota, nesmí přesáhnout 45 °C, jinak nebude splněna podmínka lisování za studena. Na výrobu meruňkového oleje lisovaného za studena je potřeba velké množství surovin (meruňkových

jader), než při výrobě stejného množství rafinovaného oleje, proto je olej vyráběný touto cestou velice drahý. Lisování za studena způsobuje kratší trvanlivost, ale za to výraznější chuť a vůni než u průmyslově vyráběných olejů [11], [14].

Druhým způsobem získávání meruňkového oleje je extrakce. Při tomto procesu je důležité, aby došlo k předúpravě semen, a tím k hlubokému narušení pletiv a buněk. Pouze pokud je splněn tento požadavek, může být zaveden model kapilárního systému, při kterém rozpouštědlo penetruje kapilárami. Rychlost extrakce nezpůsobuje vnitřní difúze rozpouštědla z kapilár do narušených i do nenarušených buněk, ale tok rozpouštědla kapilárním systémem. Olej se rozpouští v rozpouštědle a vzniká tak roztok oleje v rozpouštědle, tzv. miscela. Získané miscely musí být následně čištěny filtrací od rostlinných nečistot a následně se z nich na odparkách odstraní rozpouštědlo. Jak již bylo zmíněno, nejdůležitější roli hraje při extrakci rozpouštědlo. V ideálním případě by mělo být dobře rozpustné pro tuky a oleje, nemělo by rozpouštět látky netukového charakteru. Také by mělo mít poměrně nízké výparné teplo, dobrou smáčivost a penetraci v surovině. Nemělo by být rozpustné ve vodě a nemělo by s ní tvořit ani emulze. Takové požadavky však žádné rozpouštědlo nesplňuje, ale po dlouhodobém zkoušení se ukázalo, že ideální pro extrakci meruňkového oleje je hexan.

Meruňkový olej získaný pomocí extrakce může být čištěn procesem zvaným rafinace. Rafinace zušlechťuje surový olej, při kterém nastává odstraňování nežádoucích látek, jako např. bílkovin, slizových látek, volných mastných kyselin, barviv atd. Cílem je získat z kalného, tmavého surového oleje olej čirý, s neutrální chutí a vůní, takový olej je pak vhodný pro lidskou výživu. Oleje, které jsou získány lisováním za studena, procesem rafinace neprocházejí.

Rafinace zahrnuje operace odslizování, odkyselování, bělení a deodoraci. Procesem odslizování se rozumí odstranění suspendovaných nerozpustných a původně rozpustných látek schopných hydratace, díky které pak přechází na rozpustnou formu. Olej je zbavován fosfolipidů, polysacharidů (rostlinných slizů), bílkovin i přebytečné vody. Celý proces odstraňování nerozpustných látek probíhá pomocí hydratace, přidá se malé množství vody, roztok se zahřeje a následně odstředí.

Odkyselování se provádí za účelem odstranění volných mastných kyselin, které mají nežádoucí vliv na vůni a chuť oleje. Nejčastěji se používá proces neutralizace. Přídavkem NaOH vzniknou mýdla, nerozpustná v oleji, která jsou z roztoku vymývána horkou vodou.

Bělením dochází k odstranění barevných látek z oleje, např. karotenoidů a chlorofylů. Bělení může být fyzikální nebo chemické. Fyzikální je založeno na adsorpci barevných látek na adsorpční materiál a chemické na působení oxidačních činidel.

Poslední operací rafinace je deodorace, která zahrnuje odstranění látek s nevhodnými chuťovými a aromatickými vlastnostmi. Tento proces se provádí pomocí destilace vodní páry pod vakuem [11], [13].

## **2.2 Biologicky aktivní látky v meruňkovém oleji**

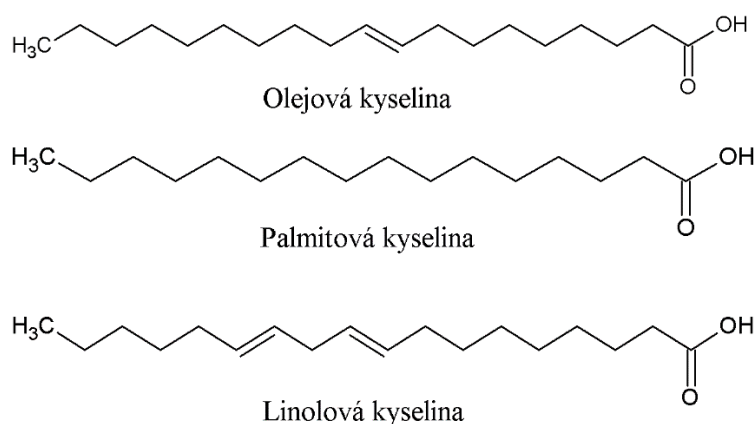
Jak již bylo zmíněno výše, meruňkový olej má široké uplatnění, jak v potravinářském, tak kosmetickém průmyslu. Je to především díky biologicky aktivním látkám, zejména mastným kyselinám, vitamínům, sacharidům, proteinům aj., které se v něm nacházejí.

## 2.2.1 Lipidy

Lipidy tvoří jednu z hlavních živin nezbytnou pro zdraví a vývoj organismu. Tyto látky však nejsou chemicky jednotné, jejich zařazení do této skupiny je posuzováno dle hydrofobnosti. Z analytického hlediska se do této skupiny řadí všechny látky, které se v podmínkách analýzy extrahují lipofilními rozpouštědly [15]. Lipidy se dají rozdělit na neutrální a polární, podle chování sloučenin při chromatografickém dělení. Mezi neutrální lipidy se řadí estery glycerolu, steroly a jejich estery, ale také volné mastné kyseliny, ačkoli nejsou neutrální. Polární lipidy pak zahrnují fosfolipidy [16]. V meruňkovém oleji je přibližně (43–53) % těchto látek [17].

Mastné kyseliny patří k nejdůležitějším a nejvýznamnějším složkám lipidů. Nachází se obvykle v esterifikované formě jako součást jiných lipidů (např. fosfolipidů nebo acylglycerolů), nikoliv volně [15].

Již dříve bylo zmíněno, že se v meruňkovém oleji nachází hlavně nenasycené mastné kyseliny, zejména kyselina olejová, linolová a nasycená kyselina palmitová, jejich struktury můžeme vidět na Obr. 3 [18]. Kyselina olejová se řadí mezi mononenasycené  $\omega$ -9 mastné kyseliny a její obsah v meruňkovém oleji se pohybuje v rozmezí (60–70) %. Snižuje krevní tlak a špatný cholesterol (LDL), naopak zvyšuje obsah zdravého cholesterolu (HDL) [18], [19]. V případě kyseliny linolové se jedná o polynenasycenou  $\omega$ -6 mastnou kyselinu, jejíž množství v meruňkovém oleji je (20–30) % [18]. Jedná se o esenciální mastnou kyselinu, jejíž nedostatek vyvolává odlupování kůže, vypadávání vlasů a špatné hojení ran [20]. Nasycené kyseliny palmitové se uvádí obsah v oleji přibližně (3–8) % a spolu s kyselinou linolovou se dobře vstřebávají do kůže a nesou tak s sebou další látky např. vitamíny [18], [21].



Obr. 3: Struktury nejvíce zastoupených mastných kyselin v meruňkovém oleji [19], [20], [21]

## 2.2.2 Sacharidy

Sacharidy jsou biologicky aktivní látky nebo složky mnoha biologicky aktivních látek jako např. vitamínů, koenzymů, hormonů, glykoproteinů apod. Jedná se o základní stavební jednotky mnoha buněk, a především o hlavní zdroj energie pro činnost všech buněk a tkání. Jejich funkcí je také chránit buňku před působením vnějších vlivů [22]. Podle počtu cukerných jednotek vázaných v molekule se sacharidy dělí na oligosacharidy, monosacharidy, polysacharidy a složené sacharidy. Stejně jako lipidy a bílkoviny tvoří hlavní složky potravy [23].

Cukry jsou obsaženy hlavně v potravinách rostlinného původu. V potravinách živočišného původu se nacházejí v malém množství a zpravidla se jedná pouze o glukosu a glykogen [22]. V ovoci se v relativně velkém množství nachází monosacharidy, složené z jedné cukerné

jednotky, jedná se především o glukosu a fruktosu. Jejich obsah se zvyšuje během zrání, závisí však i na druhu ovoce, stupni zralosti, podmínkách skladování po sklizení plodů a zpracování [23].

V potravinářství často dochází k náhražkám meruněk, respektive meruňkových jader, jádru broskví nebo dýní, což vede ke zhoršení kvality potravin. Bylo vyzkoušeno mnoho způsobů k odhalení tohoto falšování potravin, jako ideální se nakonec ukázalo právě stanovení obsahu sacharidů [24]. Toto množství se dle druhu meruněk pohybuje v rozmezí (7–14) % [17].

### 2.2.3 Polysacharidy

Polysacharidy neboli glykany se skládají z více než deseti monosacharidových jednotek a obsahují několik tisíc strukturních jednotek vzájemně spojených glykosidovými vazbami. Jsou tvořeny buď výjimečně identickými monomery, s výjimkou koncových jednotek, nebo častěji se skládají z molekul dvou a více různých monosacharidů nebo obsahují jejich deriváty, např. estery, deoxycukry aj. Polysacharidy lze rozdělit na homo a heteropolysacharidy. Homopolysacharidy jsou tvořeny pouze z molekul D-glukosy, což splňuje amylosa, amylopektin, glykogen a celuloza. Mezi heteropolysacharidy pak patří většina dalších polysacharidů [23].

Pro naši práci je významným polysacharidem vláknina. Vláknina zahrnuje strukturální sacharidy nacházející se v buněčných stěnách rostlinných buněk. Jedná se o směs celulózy, hemicelulózy a nestravitelných inkrustujících látek, jako je lignin, kutin a křemičitany. Vláknina tvoří významnou složku potravy, která je však sama o sobě obtížně stravitelná. Její stravitelnost závisí právě na poměru mezi sacharidy (celulózy a hemicelulózy) a ligninem. Existují dva druhy vlákniny, a to, rozpustná a nerozpustná. Rozpustná vláknina má schopnost absorbovat vodu a bobtnat. V trávicím traktu se neštěpí běžnými trávicími enzymy, k trávení dochází pouze prostřednictvím mikrobiální fermentace, a díky tomu může být také zdrojem energie. Z větší části je tudíž živinou pro mikroorganismy v trávicím traktu a působí tak jako tzv. prebiotikum. Rozpustná vláknina také reguluje trávení tuků a sacharidů, tím, že na sebe váže vodu a nabývá tak na objemu způsobuje pocit nasycení. Zdrojem rozpustné vlákniny jsou prakticky veškeré luštěniny, některé ovoce a zeleniny a také oves, žito a ječmen. Nerozpustná vláknina v trávicím traktu nefermentuje, tudíž není zdrojem energie. Zvětšuje objem obsahu ve střevech, a tím zkracuje dobu setrvání potravy v této oblasti. Má příznivou funkci v tlustém střevě, kde se díky zvětšení objemu stolice naředí odpadní látky vzniklé při trávení, a tak snadněji opouštějí trávicí trakt, který je pak vystaven styku s potenciálně nebezpečnými látkami kratší dobu. Zdrojem nerozpustné vlákniny jsou různé ořechy a semena, slupky některých druhů ovoce, obilné slupky a otruby [25], [26]. Obsah vlákniny v meruňkových jádrech by měl být okolo (7–10,8) % [17].

### 2.2.4 Bílkoviny

Bílkoviny (proteiny) jsou polymery aminokyselin vzniklé procesem proteosyntézy. V molekule obsahují běžně více než 100 aminokyselin, které jsou mezi sebou vázány peptidovou vazbou do lineárních řetězců. Po vodě tvoří proteiny většinu hmoty živých organismů. Vykonávají řadu biologických funkcí, dle kterých se dělí na strukturní, katalytické, transportní, pohybové, obranné a další proteiny. Pro živočichy je však nejdůležitější výživová funkce proteinů, která zajišťuje zdroj esenciálních aminokyselin a je tak hlavním zdrojem dusíku v potravě a hmoty potřebné k výstavbě a obnově živočišných tkání [27]. U meruňkových jader se uvádí obsah bílkovin okolo (23–27) % [17].

### 2.2.5 Antioxidanty

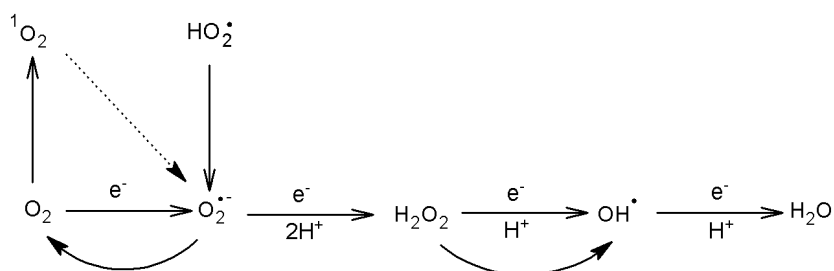
Antioxidanty jsou látky, které omezují aktivitu kyslíkových radikálů, tím, že snižují pravděpodobnost jejich vzniku nebo je převádějí do méně reaktivních nebo nereaktivních stavů. Omezují tak proces oxidace v organismu nebo směsích, ve kterých se vyskytují. Právě proto se tyto látky často přidávají do potravin, u kterých by mohlo vlivem oxidace dojít k jejich poškození [28].

#### *Volné radikály*

Na buňky lidského organismu působí stále velké množství nepříznivých vlivů. Mezi hlavní patří volné kyslíkové radikály, které jsou nevyhnutelnou součástí aerobního metabolismu [28]. Atmosférický kyslík je biradikál, obsahuje 2 nepárové elektrony a tím se liší od ostatních plynných prvků. Díky této vlastnosti se molekula kyslíku vyznačuje také paramagnetickými vlastnostmi. Nepárové elektrony molekuly kyslíku mají paralelní spin, což podle Pauliho principu zabráňuje reakci s bivalentním reduktantem. Reakce by tedy mohla probíhat pouze tehdy, pokud by tento reduktant měl také 2 nepárové elektrony s nepárovým spinem, s opačnou orientací k tomu, jaký má molekulární kyslík. Pravděpodobnost takové reakce je však velmi nízká.

Molekulární kyslík je poměrně málo reaktivní a jeho aktivace probíhá různými mechanismy, které můžeme vidět na Obr. 4. Prvním z nich je absorpce dostatečné energie potřebné k obrácení spinu jednoho z nepárových elektronů za vzniku singletového kyslíku ( $^1\text{O}_2$ ), který je na rozdíl od molekulárního kyslíku velmi reaktivní. Singletový kyslík může svou excitační energii přenést buď na jiné molekuly, nebo s nimi může reagovat za vzniku hydroperoxidů. Druhou možností je aktivace kyslíku jednoelektronovou redukcí, při které dochází k tvorbě superoxidu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), peroxidu vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxylového radikálu ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) a vody. Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu tak vyžaduje celkem 4 elektrony a vždy je doprovázena postupnou jedno až tří elektronovou redukcí za tvorby superoxidového radikálu, peroxidu vodíku a hydroxylového radikálu. Reakční řetězec vyžaduje v prvním kroku iniciaci, ale další kroky reakce jsou exotermní, a tudíž mohou probíhat samovolně. První reakce vede k tvorbě superoxidového anionradikálu ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). Superoxid je mírně reaktivní, krátce žijící forma kyslíku, která neprochází přes biologické membrány a díky tomu funguje jako oxidační i redukční činidlo. Oxiduje například askorbát, NADPH, některé aminokyseliny a komplexy přechodných kovů, čímž ovlivňuje aktivitu metaloenzymů. V živém organismu je superoxidový radikál v rovnováze se svou proponovanou formou-perhydroxylovým radikálem ( $\text{O}_2\text{H}^{\cdot}$ ). Tento radikál je více hydrofobní než superoxid a může tak jednodušeji proniknout přes lipidovou membránovou dvojvrstvu. Zde odebírá protony z polynenasycených mastných kyselin a lipidových hydroperoxidů a tím zahajuje oxidaci lipidů. Ve vodném rozpouštědle, v neutrálním nebo mírně kyselém pH tento radikál v obou formách dismutuje na peroxid vodíku a kyslík. Tato reakce probíhá samovolně nebo za pomoci enzymu superoxiddismutasy [29].





Obr. 4: Celková redukce molekulárního kyslíku na vodu [29]

Volné radikály se většinou dostávají do organismu z vnějšího prostředí. Vznikají však i ve vnitřním prostředí organismu, a to v průběhu metabolismů. Příčiny vzniku jsou buď exogenní, nebo endogenní radikály. Exogenní typ je zapříčiněn toxickými sloučeninami, které jsou vystavovány silnému slunečnímu nebo jinému záření, kouřením a stresem. Mezi exogenní radikály patří vitamíny, přirozené látky a uměle vytvořené léky. Na každou buňku denně působí řádově deset tisíc volných radikálů [30].

### ***Vliv volných radikálů na živé systémy***

Volné radikály primárně působí na biologicky významné makromolekuly, jako jsou bílkoviny, tuky a nukleové kyseliny. Jejich reakce jsou doprovázeny vznikem vazeb uvnitř makromolekul, jak mezi jednotlivými řetězci makromolekul, tak i mezi sousedními makromolekulami. Důsledkem tohoto vlivu může docházet ke ztrátě enzymatické aktivity bílkovin, dále ke ztrátě informací u DNA, a tudíž k poškození a zániku buňky a vzniku buňky nádorové. Vlivem volných radikálů jsou způsobeny i změny vlastností buněčných membrán, které mohou vést k poškození a zániku buněk, tkání i orgánů [31].

### ***Ochrana proti působení volných radikálů***

Mechanismy vedoucí ke snížení produkce volných radikálů se dělí na enzymatickou a neenzymatickou obranu. Enzymatická obrana neboli vnitřní obrana buněk je zprostředkována pomocí enzymu superoxid-dismutázy peroxidázy. Tuto obranu lze posílit dodáním tzv. kofaktorů, například zinku a selenu. Kofaktory musí být přijímány ve formě vhodných sloučenin, samy o sobě mohou být pro organismus jedovaté. Neenzymatickou obranu lze zajistit příjmem potravy obohacené právě o antioxidační látky. Do této skupiny látek patří zejména vitamíny C, A a E, dále také flavonoidy, fenolické antioxidanty-polyfenoly, některé sloučeniny selenu, zinku, mědi, antioxidanty na bázi aminokyselin-glutathion, taurin a čisté uhlovodíky, např. skvalen, který je zdrojem buněčného kyslíku [31].

### ***Oxidační stres***

Oxidační stres je způsoben nerovnováhou mezi volnými radikály a antioxidanty. Tento děj nastává při převaze volných radikálů. Tím dochází k ohrožení organismu a vyvolání různých nebezpečných chorob, jako jsou např. Alzheimerova a Parkinsonova choroba, chronické střevní záněty, aj. Právě proto si organismus vyvinul účinnou antioxidační ochranu, která však nezaručuje úplné odstranění volných radikálů. Oxidační stres je podstatou fyziologického stárnutí, kdy dochází k akumulaci malých chyb v systému antioxidační ochrany. Volné radikály však nemají pouze negativní vliv na organismus, plní i řadu fyziologických funkcí. Při zánětlivé reakci produkují aktivované fagocyty superoxid proti mikrobům a např. spermie potřebují superoxid k narušení membrány vajíčka. Oxidační stres je tedy běžností každodenního života [30].

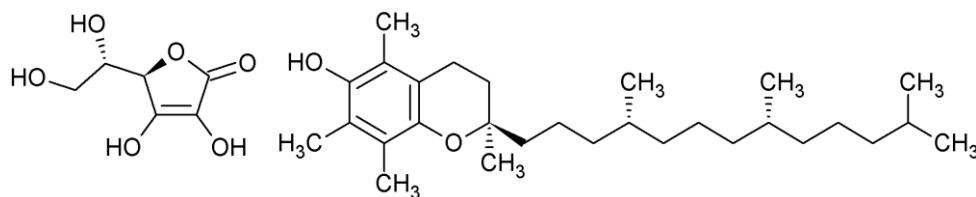
## 2.2.6 Vybrané antioxidační látky

### Vitamíny

Vitamíny jsou organické nízkomolekulární sloučeniny syntetizované téměř výhradně autotrofními organismy. Heterotrofní organismy je syntetizují jen ve velmi omezené míře a musí je tak získávat z exogenních zdrojů, potravy. Tyto látky nejsou zdrojem energie ani stavebním materiálem, ale jsou v minimálním množství nezbytné pro látkovou přeměnu a regulaci metabolismu člověka. Vesměs plní funkci jako součást katalyzátorů biochemických reakcí [32].

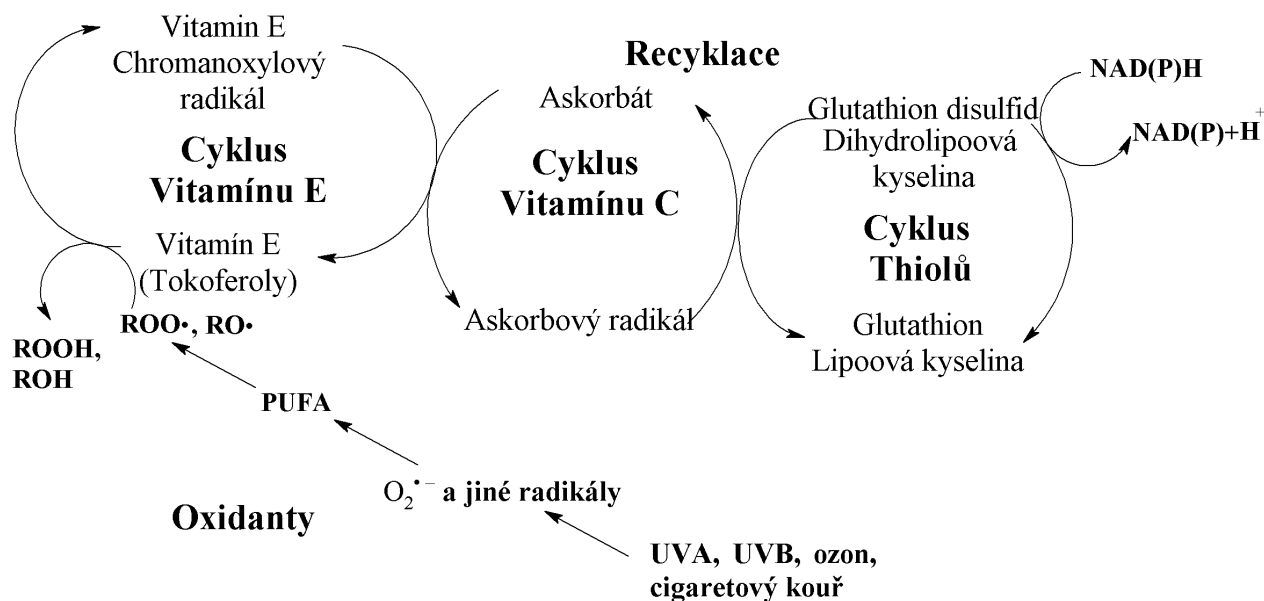
V meruňkovém oleji se setkáváme zejména s vitamínem C a E. V případě vitamínu C neboli kyseliny L-askorbové, jejíž strukturu můžeme vidět na Obr. 5 vlevo, se jedná o vitamín rozpustný ve vodě. Je syntetizován v cytosolu z hexosových cukerných jednotek u rostlin, mikroorganismů a většiny živočichů s výjimkou člověka, primátů, netopýrů a morčat. Pro člověka se tedy jedná o esenciální složku, kterou musí přijímat z potravy, z ovoce a zeleniny. Díky svým vlastnostem, vitamín a chelatační činidlo, má kyselina askorbová široké použití jako potravinářské aditivum [33].

Jak již bylo zmíněno výše, kyselina askorbová patří mezi hlavní antioxidační látky. Za fyziologických podmínek má askorbát schopnost uvolnit elektrony v řadě enzymových i neenzymových reakcí a díky tomu se jedná o detoxifikační sloučeninu aktivní formy kyslíku ve vodné fázi. Askorbát může přímo odstraňovat superoxid, hydroxylové radikály, singletový kyslík a redukovat peroxid vodíku na vodu. Vitamín C udržuje rozložení nadbytku excitační energie a regeneruje tokoferol z tokoferoxylového radikálu, čímž chrání membránu [29].



Obr. 5: Struktura kyseliny L-askorbové (vlevo) a tokoferolu (vpravo) [33], [34]

Vitamín E neboli tokoferol je vitamín rozpustný v tucích a jeho strukturu můžeme vidět na Obr. 5 vpravo. Jeho nejaktivnější formou je  $\alpha$ -tokoferol, který jako jediný, ze všech forem tokoferolu, splňuje požadavky lidského organismu. Syntéza tokoferolu probíhá pouze u rostlin a některých kyanobakterií. Stejně jako u vitamínu C se jedná o esenciální látku nutnou přijímat z potravy. Tokoferol se nachází především v tucích a olejích. Při rafinaci olejů dochází ke snížení obsahu tokoferolu na (10–50) % původního obsahu. K hlavní ztrátě dochází při odkyselování, v důsledku oxidace vitamínu v alkalickém prostředí, a při procesu bělení. Při deodoraci jsou ztráty způsobeny hlavně těkáním s vodní parou za sníženého tlaku [34]. Vitamín E je nejdůležitější membránový antioxidant, který je součástí lipidových membrán buněk. Inhibuje řetězové radikálové reakce, tím, že přímo vychytává volné radikály. Na Obr. 6 můžeme vidět aktivaci sítě antioxidantů prostřednictvím oxidačního stresu. Askorbát, redukovaný glutathion a tokoferol synergisticky inhibují oxidační poškození buněčných membrán. Proto se tokoferol označuje jako faktor zpomalující proces stárnutí organismu a uplatňuje se v prevenci kardiovaskulárních chorob a vzniku rakoviny, onkogeneze [29], [35].



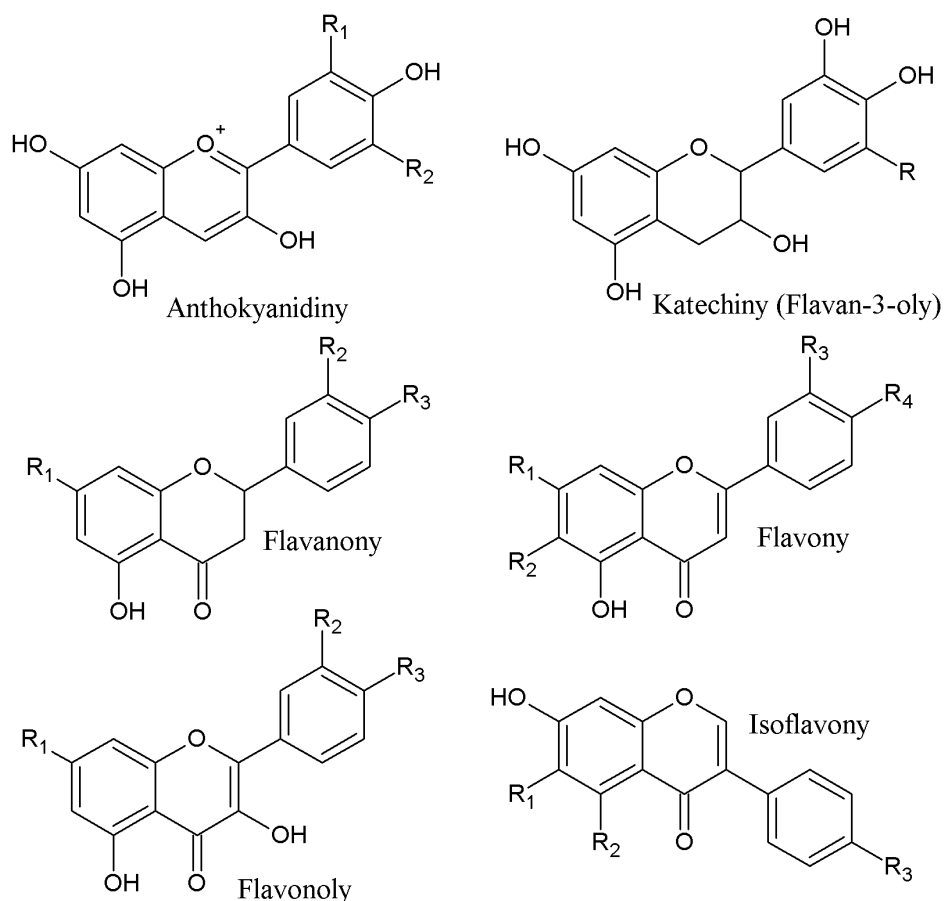
Obr. 6: Cyklus regenerace antioxidantů vyvolán oxidačním stresem [35]

### Fenolické sloučeniny

Fenolické sloučeniny jsou v organické chemii označovány jako třída sloučenin obsahující hydroxylovou funkční skupinu přímo vázanou na aromatické jádro. Tyto sloučeniny se nachází zejména v ovoci, zelenině, ale i některých bylinkách. Mohou vytvářet komplexy s kovy za vzniku chelátů a také se aktivně podílí v navazování volných radikálů. Fenolické sloučeniny jsou schopny inhibovat enzymy, které katalyzují volné radikály, a tím přispívají k celkové antioxidační ochraně lidského organismu [36], [37].

Do této skupiny patří řada látek, nás však u meruňkového oleje zajímá nejvíce skupina polyfenolů a flavonoidů. Polyfenoly jsou přírodní látky nacházející se v rostlinách. Jejich struktura je tvořena fenolovými jednotkami a vychází ze šikimátové metabolické dráhy sekundárního metabolismu rostlin. Polyfenoly se nachází především v ovoci, zelenině, zeleném čaji a bylinách. Tyto sloučeniny vykazují škálu biologických účinků, zejména antimikrobní a antioxidační vlastnosti, na kterých se podílí zejména fenolové kyseliny a flavonoidy [38].

Flavonoidy jsou největší skupinou polyfenolových sloučenin. Jedná se také o rostlinné sekundární metabolity, resp. žlutá barviva rostlin, které se skládají ze dvou benzenových kruhů spojených tříuhlíkatým řetězcem. Nejčastěji se nachází ve formě glykosidů, protože právě v této formě nepodléhají účinkům polyfenoloxidas. Flavonoidy jsou významné díky své antioxidační aktivitě. Dokážou zhaset hydroxylové a peroxidové radikály a také vychytávat ionty kovů. Do této skupiny patří zhruba 60 látek, které mají obvykle pozitivní vliv na lidský organismus, především na cévní systém. Dle stupně oxidace a substituce tříuhlíkatého řetězce se rozeznávají základní struktury flavonoidů, které můžeme vidět na Obr. 7 [37], [39].



Obr. 7: Základní struktury flavonoidů [37]

## 2.3 Metody analýzy meruňkového oleje, jader a pokrutiny

### 2.3.1 Izolace a stanovení celkových lipidů

Stanovení obsahu celkových lipidů ve vzorku zahrnuje jejich izolaci a následně vážkové stanovení. Nejprve se připraví vzorek k extrakci tuku, dojde k uvolnění tuku z vazby, poté následuje extrakce tuku nepolárním až středně polárním rozpouštědlem. Nakonec se zbylé rozpouštědlo odpaří a extrakt tuku se zváží.

Extrakce může být provedena hned několika způsoby. Prvním způsobem může být stanovení tuku extrakcí dle Soxhleta nebo Twosselmann. Dochází k extrakci tuhého vzorku umístěného v extrakční patroně kondenzátem par rozpouštědla. Metody jsou vhodné pro analýzu olejnin a podobných materiálů bohatých na neutrální lipidy s nízkým obsahem vody.

Extrakce tuhého vzorku v uzavřené nádobě velkým přebytkem rozpouštědla metodou dle Folsche. Metoda je vhodná pro vzorky s vyšším obsahem vody a polárních lipidů, tudíž pro potraviny živočišného původu, kde přidavkem metanolu k extrakčnímu rozpouštědlu dojde ke kvantitativnímu uvolnění lipidů vázaných na bílkovinné podíly.

Další možností je stanovení tuku podle Grossfelda. Metoda se používá pro pečivo a jiné výrobky s vysokým obsahem sacharidů. Metoda dle Röseho a Gottlieba, která je vhodná pro vzorky s vyšším obsahem vody, lipoproteinů a sacharidů, zejména pro stanovení tuku v mléce a mléčných výrobcích [40].

### 2.3.2 Stanovení funkčních skupin lipidů

Klasická analýza tuků a olejů zahrnovala stanovení tzv. tukových čísel, která jsou měřítkem obsahu různých funkčních skupin. Řadu stanovení v dnešní době nahradily chromatografické metody. Stále má však význam stanovení čísla kyselosti, čísla zmydlnění, esterového a jodového čísla, které se stanovují pomocí titrací [40].

#### *Číslo kyselosti*

Číslo kyselosti udává míru obsahu volných mastných kyselin [40]. Vyjadřuje se jako hmotnost KOH v mg potřebná k neutralizaci 1 g tuku. Číslo kyselosti je také kritériem kvality surovin k výrobě jedlých tuků a případných změn při různých technologických operacích, například při smažení [41].

#### *Číslo zmydlnění*

Míru obsahu veškerých mastných kyselin udává číslo zmydlnění. Tato hodnota udává hmotnost hydroxidu draselného v mg, potřebnou k neutralizaci volných i vázaných mastných kyselin v 1 g tuku [41].

#### *Esterové číslo*

Esterové číslo udává hmotnost KOH v mg, která je potřebná k neutralizaci estericky vázaných kyselin v 1 g tuku. Jeho stanovení se provede pomocí výpočtu rozdílu čísla zmydlnění a čísla kyselosti. Následně z něj lze i vypočítat procentuální zastoupení glycerolu v tuku [41].

#### *Jodové číslo*

Jodové číslo udává hmotnost jodu v gramech, která se aduje na 100 g tuku za podmínek metody. Dle tohoto čísla se určuje množství dvojných vazeb (nenasycených mastných kyselin) v tuku. Dále slouží k identifikaci neznámých tuků a k posouzení použitelnosti tuku pro různé účely. Problémem je pomalá reakce jodu, protože brom s chlorem jsou naopak příliš reaktivní, dochází mimo adice také k substituci. Proto se stanovení jodového čísla podle Hanuše provádí pomocí bromidu jodného (jodmonobromidu), jehož reaktivita je vhodná právě pro stanovení nenасыcenosti tuků. Nezreagovaný jodmonobromid se přidáním KI převede na jod dle Rovnice (1) [41]:



Jodové číslo má význam pro kontrolu výsledků plynové chromatografie, zvláště u složitých směsí [40].

### 2.3.3 Stanovení mastných kyselin

Stanovení mastných kyselin se provádí metodou plynové chromatografie [40]. Obecně je chromatografie separační analytická metoda, při které dochází k separaci mezi nepohyblivou stacionární a pohyblivou mobilní fází. U plynové chromatografie tvoří mobilní fází nosný plyn, který unáší vzorek, rovněž v plynném skupenství, kolonou. K separaci dochází na základě schopnosti složek poutat se na stacionární fází. Po opuštění kolony putují složky na detektor. Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení jednotlivých složek.

U plynové chromatografie lze využít různé druhy detektorů, například tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenový ionizační detektor (FID), detektor elektronového zachytu (ECD)

nebo také fotoionizační detektor (PID). Tepelně vodivostní detektor patří mezi univerzální detektory. Nosný plyn proudí přes vlákno žhavené stálým elektrickým proudem a ochlazuje ho na určitou teplotu. Přítomnost složky změní tepelnou vodivost prostředí kolem žhaveného vlákna, a tím i jeho teplotu a elektrický odpor. Dochází tedy k porovnávání vodivosti čistého nosného (referenčního) plynu a vzorku. V případě plamenového ionizačního detektoru se molekuly plynu nejprve ionizují v kyslíkovodíkovém plameni a vedou ionizační proud mezi elektrodami. Nosný plyn se před vstupem do hořáku mísí s vodíkem a vzduch je přiváděn z vnějšku. Přítomnost složky zvýší ionizaci a elektrický proud se zvětší. Jedná se o velice citlivý detektor, který detekuje prakticky vše, kromě anorganických par a plynů. Detektor elektronového záchytu využívá radioaktivního zářiče  $^{63}\text{Ni}$ , který svým zářením  $\beta$ , proudem rychlých elektronů, ionizuje molekuly dusíku jako nosného plynu a vyvolává tak ionizační proud. Dochází k uvolňování pomalých elektronů, které zachycují elektronegativní atomy složek, a díky tomu snižují ionizační proud. ECD je poměrně citlivý detektor především na halogenované sloučeniny. Ionizaci látek u fotoionizačního detektoru způsobuje UV záření. Selektivitu detektoru lze ovlivnit vhodnou volbou vlnové délky UV záření: Tento detektor je velice citlivý, asi 100krát více než FID a je vhodný pro organické látky, kyslík, amoniak a sulfan. Naopak se neionizují některé anorganické plyny (dusík, oxid uhelnatý a uhlíčitý, helium a voda) [42].

Při stanovení jsou mastné kyseliny nejprve převedeny na methylestery, které se následně separují. Jako stacionární fáze se používají polyestery a pro detekci plamenový ionizační detektor. Jednotlivé složky se identifikují na základě elučních časů a z plochy píků se vypočte poměrné zastoupení jednotlivých kyselin ve směsi v hmotnostních procentech. Metoda je vhodná pro běžné tuky a oleje s výjimkou mléčných tuků, protože obsahují kyseliny s krátkým řetězcem [40].

### 2.3.4 Stanovení sacharidů

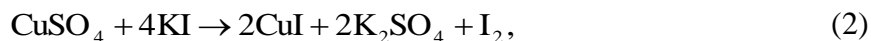
Sacharidy se stanovují metodami fyzikálními, chemickými i biochemickými. Analýza se provádí buď přímo u některých cukrovarnických produktů, nebo z extraktů u ostatních surovin a potravin, do nichž cukry přechází [22].

U stanovení sacharidů je nejprve obvykle nutná izolace z potravinářských surovin a potravin, nejčastěji pomocí extrakce. Před extrakcí by měl být materiál dokonale rozemletý, na což lze použít několik typů mlýnků a homogenizátorů. Jako extrakční činidlo se obvykle používá voda nebo 80% etanol, který je vhodnější především u vzorků, kde může docházet k enzymovým reakcím, například k tvorbě redukujících cukrů ze škrobu nebo k enzymové inverzi sacharosy. Teplota extrakce by neměla překročit 40–50 °C, aby nedošlo k porušení koloidního systému vzorku. Dále může být izolace sacharidů provedena pomocí hydrolýzy nebo chromatografickými metodami [22].

Jak již bylo zmíněno výše, cukry mohou být stanoveny fyzikálními, chemickými a biochemickými metodami. Mezi fyzikální stanovení patří denzimetrické a refraktometrické metody, založené na rozdílných indexech lomu. Dále polarimetrické stanovení, které je založeno na měření optické aktivity látek a jsou zde zařazeny i chromatografické metody, zejména sloupcová chromatografie, chromatografie na papíře, plynová a kapalinová chromatografie [22].

Chemické metody využívají redukčních vlastností sacharidů, případně jejich štěpných produktů v alkalickém prostředí. U Bertrandovy metody redukující cukry vyredukuje z Fehlingova roztoku oxid měďný, který následně reaguje v kyselém prostředí s roztokem síranu

železitého za vzniku ekvivalentního množství síranu železnatého. Síran železnatý se nakonec stanoví manganometricky. Jedná se prakticky o univerzální metodu použitelnou pro všechny potraviny a potravinářské suroviny. Schoorlova metoda je založená na tom, že redukující cukry redukuje roztok měďnaté soli a nadbytečná nezreagovaná měď se stanoví jodometricky tak, že reaguje v kyselém prostředí s KI a uvolněný jod se ztitruje thiosíranem sodným. Celé stanovení probíhá dle Rovnice (2) a (3):



Dále může být použita Ofnerova metoda založená, stejně jako předchozí dvě metody, na stanovení oxidu měďnatého [22], [43].

Chemické stanovení může být provedeno i prostřednictvím metod založených na barevných kondenzačních reakcích degradačních produktů cukrů. Zde patří například stanovení neutrálních sacharidů dle Duboise a stanovení redukujících cukrů mikrometodou podle Somogyiho [22], [43]. V případě Duboisovy metody se jedná o dehydrataci cukrů kyselinou sírovou a následnou kondenzaci vzniklého furfuralu či 5-hydroxyfurfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů. Ty lze spektrofotometricky stanovit při vlnové délce 490 nm. Neutrálními sacharidy rozumíme tzv. pravé cukry, tedy se nejedná o např. o jejich aminoderiváty [44]. Pomocí spektrofotometrie probíhá i stanovení redukujících cukrů dle Somogyiho. Oxid měďný vyredukovaný redukujícími cukry se přidavkem arsenomolybdenového činidla podle Nelsona převede na barevný komplex. Zbarvení komplexu se proměří právě spektrofotometricky při vlnové délce 820 nm [43].

### 2.3.5 Stanovení nevyužitelných polysacharidů-vlákniny

Při stanovení vlákniny jsou využívány chemické a enzymové metody, nejrozšířenější je metoda Hennebergova-Stohmannova [22]. Působením 5% roztoku kyseliny sírové a 5% roztoku hydroxidu sodného se balastní látky převedou do roztoku a získá se vláknina, která se stanoví vážkově. Metoda je vhodná pro většinu potravinářských surovin [41].

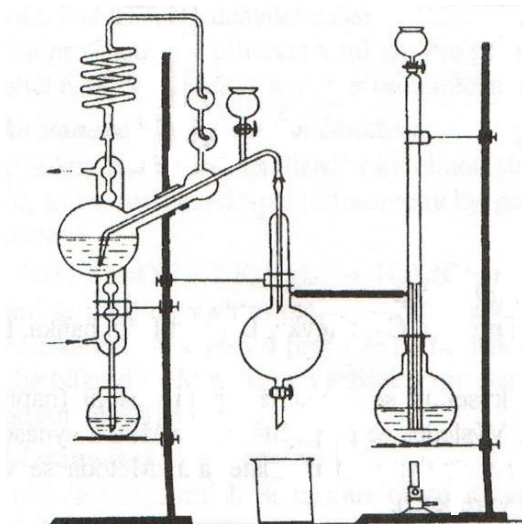
### 2.3.6 Stanovení bílkovin

Metody pro stanovení bílkovin lze rozdělit do dvou základních skupin. První skupina je vhodná pro stanovení bílkovin ve směsi s jinými složkami potravin. Tato skupina je v analýze potravin častější, rychlejší a spolehlivější než druhá skupina metod, která je vhodná pro stanovení bílkovin v čistých bílkovinných preparátech, je časově náročnější a vyžaduje speciální zařízení. Analytickou orientaci o obsahu bílkovin získáme stanovením celkového obsahu dusíku, vyjádřeného tzv. hrubou bílkovinou, která představuje v potravinářských surovinách a produktech (0,5–40) % [45].

Hrubá bílkovina se nejčastěji stanovuje po mineralizaci vzorku na amoniakální formu Kjeldahlovou nebo Dumasovou metodou, popřípadě Nesslerovým činidlem. Bílkoviny rozpustné v roztoku lze stanovit spektrofotometricky biuretovou reakcí nebo Nesslerovým činidlem [41].

Stanovení celkového dusíku dle Kjeldahla zahrnuje mineralizaci vzorku varem v koncentrované kyselině sírové za přidavku katalyzátoru. Dusíkaté látky se převedou na síran amonný, z něhož se v alkalickém prostředí uvolní amoniak. Amoniak se předestiluje vodní parou a stanoví se titračně. K stanovení dusíku touto metodou se využívá Parnas-Wagnerův přístroj,

který lze vidět na Obr. 8. Metoda má univerzální použití pro běžné potraviny a potravinářské suroviny s ne příliš nízkým obsahem dusíku [41].



Obr. 8: Parnas-Wagnerův přístroj [41]

Jak již bylo zmíněno výše, další z možných metod stanovení bílkovin je pomocí spektrofotometrie a Nesslerového činidla. Dusík vázaný v bílkovinách se mineralizací s kyselinou sírovou převede v amonnou sůl, která se stanoví, po reakci s Nesslerovým činidlem, spektrofotometricky, při vlnové délce 450 nm. Metoda je vhodná pro stanovení bílkovin i v potravinářských materiálech s nižším obsahem dusíku [41].

### 2.3.7 Stanovení metodou HPLC – kyselina askorbová, tokoferol

Pro identifikaci a stanovení koncentrace vitamínu C a E se nejčastěji používá vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Jak už jsme se mohli dočíst v Kapitole 2.3.3, chromatografie je analytická separační metoda. Na rozdíl od plynové chromatografie je v kapalinové chromatografii mobilní fází kapalina. Dalším rozdílem je, že v kapalinové chromatografii rozhodují o separaci složek vzorku nejen jejich interakce se stacionární fází, ale výrazný vliv má i mobilní fáze. Separace tedy závisí na afinitě analytu k stacionární nebo mobilní fázi.

U vysoce účinné kapalinové chromatografie je kolona naplněna sorbentem (stacionární fází) s malou velikostí zrníček, která kladou prostupující kapalině značný odpor, a proto je nutné pracovat při vysokém tlaku. Na horní vrstvu náplně se dávkuje malé množství vzorku a pak dojde k přidavku mobilní fáze (eluentu). Působením gravitační síly mobilní fáze putuje kolonou, složky vzorku se separují a opouštějí kolonu v různých časech.

Stejně jako u plynové chromatografie hraje důležitou roli detekce. Detektory v HPLC by měly být selektivní pro analyt a málo citlivé na mobilní fázi. Nejvíce používanými detektory jsou fotometrické, refraktometrické a fluorescenční. Fotometrické detektory patří k nejběžnějším detektorům. Měří absorbanci eluátu vycházejícího z kolony. Nevýhodou těchto detektorů je neschopnost zaznamenávat složky, které neabsorbují UV záření. Existuje několik druhů těchto detektorů. Například UV-VIS detektor s fixní vlnovou délkou, s nastavitelnou vlnovou délkou nebo s diodovým polem, tzv. PDA detektory. PDA detektory jsou schopny zaznamenávat celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Detekce je zajištěna polem



fotodiod, jejichž počet určuje spektrální rozlišení detektoru a umožňují detekci analytu při jakékoliv zvolené vlnové délce. Dále může být použit fluorescenční detektor založen na měření sekundárního (emisního) záření, které je vyzařeno látkou po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Refraktometrický detektor měří rozdíly mezi indexem lomu eluátu a čisté mobilní fáze [42].

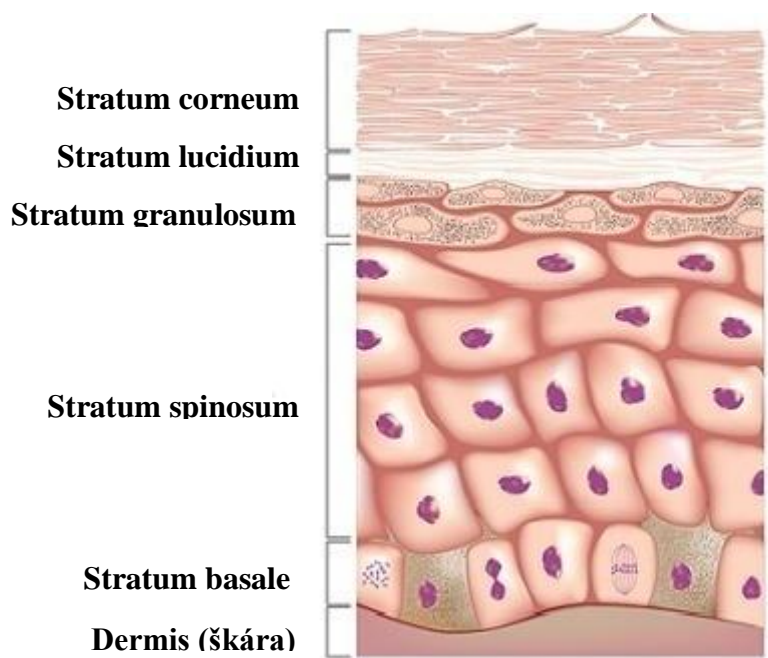
### **2.3.8 Stanovení vody a sušiny**

Voda se nachází prakticky ve všech potravinách. Její stanovení, resp. stanovení obsahu vlhkosti může sloužit jako ukazatel jakosti a trvanlivosti výrobku. Stanovením sušiny čili pevného zbytku po odstranění vody a těkajících látek, zjistíme množství určité sledované komponenty obsažené v potravinách o různém obsahu vody. Pojem sušina označuje souhrn všech organických a anorganických látek v potravě, kromě vody. Rozlišujeme rozpustnou a nerozpustnou sušinu. Rozpustná sušina zahrnuje organické a anorganické látky rozpustné ve vodě, cukry, kyseliny, barviva, některé vitamíny, dusíkaté a minerální látky. Nerozpustná sušina je pak součtem organických a anorganických látek nerozpustných ve vodě, bílkoviny, tuky, minerální látky apod. [41].

Vodu, vlhkost, je možné stanovit metodami přímými a nepřímými. Přímé metody, destilační, se používají u materiálu s vyšším obsahem vody. Běžnější jsou však metody nepřímé. Ty využívají odstranění vody a těkavých látek sušením, ať už v sušárně, ve vakuu nebo s použitím zdroje infračerveného záření [46].

## **2.4 Metody stanovení hydratace a transepidermální ztráty vody**

Hydratace kožního povrchu a transepidermální ztráta vody (TEWL) patří mezi nejdůležitější parametry při hodnocení kosmetických přípravků, resp. jejich účinků na pokožku. Obsah vody v pokožce je nezbytný pro tvorbu kožních bariér. Voda je také důležitá pro pohyb kožních buněk a aktivaci kožních enzymů. Nejsvrchnější část pokožky, stratum corneum (viz Obr. 9), která je tvořena zrohovatělými buňkami obsahující keratin, zadržuje vodu, která má tendenci prostupovat jednotlivými vrstvami až na její povrch. Tento jev bývá právě označován jako TEWL. Měření TEWL může být nepříznivě ovlivněno pocením, které může být vyvoláno za účelem ochlazení organismu nebo i psychickým stresem [47], [48].



Obr. 9: Struktura pokožky (epidermis) [49]

Existuje řada přístrojů pro měření hydratace a ztráty vody pokožky, ale mezi nejpoužívanější patří měření pomocí sond, korneometru, pro hydrataci rohové vrstvy pokožky, a tewametru pro měření hodnot TEWL.

### **Měření hydratace**

Jak již bylo zmíněno, měření hydratace se provádí pomocí korneometru. Metoda je založena na principu měření ekvivalentu elektrické kapacity. Dochází k hromadění elektrického náboje díky kondenzátoru, resp. dvou kovových destiček oddělených tenkou vrstvou izolátoru. Vlivem elektrického proudu proudí elektrony od záporné elektrody, kde jich je přebytek, ke kladné elektrodě, dokud nedojde k vyrovnání nábojů. Pojem elektrická kapacita tedy ukrývá schopnost těles hromadit náboj.

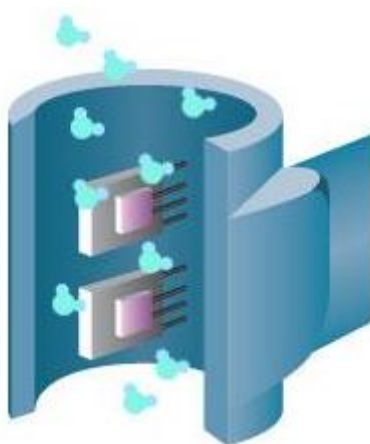
V případě korneometru se jedná o keramickou destičku, na které jsou těsně vedle sebe, paralelně zapojeny zlaté proužky. Proužky jsou zataveny skleněným krytem a vykazují vlastnosti kondenzátoru. Skleněný kryt má ochrannou funkci, tudíž nedochází k přenosu náboje do kůže, ke galvanickému spojení. Na okraji desek korneometru vzniká rozptylové pole úměrně se zmenšující se vzrůstající vzdáleností. V momentu styku kůže a sondy, s rozptylovým polem, dochází k vzrůstu její kapacity, která se již stává měřitelným jevem. Měřicí proces pomocí korneometru je zahájen přitisknutím sondy na kůži. Přístroj může stanovit obsah vody ve stratum corneum až do hloubky (20–30)  $\mu\text{m}$  [50]. Dle naměřených hodnot lze stanovit charakter pokožky, viz Tabulka 2 [51].

Tabulka 2: Hodnocení hydratace pokožky na základě měření korneometrem [51]

<b>Charakter pokožky</b>	<b>Korneometrické jednotky</b>
velmi suchá	< 30
suchá	40–45
hydratovaná	> 45

## Měření TEWL

Měření transepidermální ztráty vody se provádí za účelem zkoumání bariérové funkce kůže, ať už za fyziologických či patologických podmínek, dále k vyhodnocování iritačních testů nebo ke sledování účinků léků a kosmetických přípravků. Jak již bylo zmíněno, jako TEWL je označován tok vody pomocí difúze ze spodních, lépe hydratovaných vrstev ke kožnímu povrchu. Princip měření je tedy založen na měření difúze v otevřené komoře přístroje. Měřicí komora sondy má tvar dutého válečku a uvnitř se nachází dva senzory, teplotní a pro měření relativní vlhkosti, umístěné nad sebou, viz Obr. 10. Spodní i horní část válcovité komory je otevřená. Spodní část je určena ke kontaktu s kůží, horní část je pro únik vodní páry, která odchází z kůže do okolí. Oba senzory mají za úkol zaznamenávat spád vodní páry odcházející z pokožky přes dutý válec do okolního prostředí. Dochází tedy k měření gradientu odpařování vody přes stratum corneum, z kterého můžeme určit stav pokožky, viz Tabulka 3. Jednotkou transepidermální ztráty vody je  $\text{g/h} \cdot \text{m}^2$  [52], [53].



Obr. 10: Znárodnění sondy tewametru [53]

Tabulka 3: Hodnocení stavu pokožky na základě měření tewametrem [54]

Stav pokožky	Hodnoty TEWL ( $\text{g/h} \cdot \text{m}^2$ )
velmi dobrý	0–9
dobrá	10–14
průměrný	15–25
napjatý	25–29
kritický	> 30

## 2.5 Testy genotoxicity

Testy genotoxicity se provádí buď *in vivo*, čili za života organismu, anebo *in vitro*, mimo živý organismus. Testování jsou podrobeny nejčastěji bakterie (*E. Coli*, *B. subtilis*), kvasinky (*Saccharomyces cerevisiae*), rostliny (*Vicia foba*) nebo bezobratlý hmyz (*D. melanogaster*). Tyto testy bývají velice rychlé a málo nákladné. Existuje řada mikrobiálních testů, při kterých se nejčastěji hodnotí zlomy a poškození DNA, jako například chromozomální aberace, mikrojádra

nebo výměna sesterských chromatid. Mohou se dělat i testy náročnější, a to na savcích (myši, krysy, potkani a králíci), buněčných kulturách (savčí i lidské) nebo epidemiologické studie u lidí.

Toto testování je povinné u všech nových chemických látek a jejich směsí, které se mohou vyskytnout v prostředí a přijít tak do kontaktu s lidmi [55].

V naší práci se budeme blíže zabývat pouze mikrobiálním SOS Chromotestem prováděným na bakterii *Escherii Coli*. Jedná se o gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinkovitou bakterii, patřící do čeledě Enterobacteriaceae. Tato bakterie se nachází ve spodní části střev živočichů včetně člověka. Tento mikroorganismus je nejvíc prozkoumaným druhem, a proto se velmi často používá právě jako modelový organismus pro genetické, fyziologické i biochemické studie. *E. Coli* fermentuje cukry, především laktózu, za tvorby kyselin, jako jsou kyselina mléčná, pyrohroznová, octová a mravenčí, a plynu.

U *E. Coli* je nejvíc objasněna struktura *lac* operonu čili úsek chromozomu zajišťující indukované využití laktózy. Operon je sekvence nukleotidů, resp. řada po sobě jdoucích genů v bakteriálním chromozomu, které mají stejný promotor, jsou regulovány společným operátorem a najednou exprimovány. Tyto geny kódují většinou enzymy zapojené v jedné metabolické dráze. *Lac* operon obsahuje tři strukturní geny, pro enzym  $\beta$ -galaktosidázu štěpící laktózu uvnitř buňky na monosacharidy glukózu a galaktózu, dále pro permeázu přenášející laktózu přes cytoplazmatickou membránu a pro enzym transacetylázu, jehož funkce není doposud zcela objasněna. Jak již bylo zmíněno, před těmito strukturními geny se nachází operátor a promotor, kde začíná transkripce operonu. Transkripce je ukončena na opačném konci, na terminátoru [56].

### **SOS Chromotest**

Jak již bylo zmíněno výše, mikrobiální SOS Chromotest se provádí na bakterii *Escherii Coli* a jedná se o test na genové mutace. Bakterie patří obecně mezi nejjednodušší buňky obsahující ve své struktuře DNA a také mají velmi komplikovaný systém, díky kterému reagují činidla poškozující DNA. Tento systém je u *E. Coli* označován jako SOS reparační odpověď. Strukturní gen pro produkci enzymu  $\beta$ -galaktosidázy, *lacZ*, podléhá kontrole genu *sfiA*. SOS funkce je tedy zahrnuta v procesu inhibice buněčného dělení a aktivována je právě při poškození genetické informace. Gen *sfiA* podléhá kontrole represoru LexA, který je v případě SOS odpovědi inaktivován aktivovaným RecA proteinem. Tímto způsobem začne být přepisován gen *lacZ* a je zahájena produkce enzymu  $\beta$ -galaktosidázy, která je spektrofotometricky detekována díky přeměně specifického chromogenního substrátu. Kvůli toxicitě některých koncentrací testovaných látek, se začal používat indikátor toxického vlivu, pro spektrofotometrické sledování enzymu alkalické fosfatázy, kdy při poklesu její aktivity dojde k signalizaci toxicity. Hodnocení testu genotoxicity je tedy poměr aktivit těchto dvou enzymů.

Pro SOS Chromotest je nutné kmen *E. Coli* geneticky upravit tak, aby nebyla opravována pouze omezená poškození a došlo tak ke zvýšení citlivosti testu. Dále bylo nutné upravit buněčnou stěnu takovým způsobem, aby byl zajištěn lepší přístup testovaného materiálu do buňky [57].

Mikrobiální SOS Chromotest umožňuje detekci SOS mutagenese i po vystavení činidlu poškozujícím DNA, což je velkou výhodou tohoto testu. Další výhodou je rychlost screeningového testu genotoxicity, který trvá (4–6) hodin. Je možné ho využít pro kvantitativní analýzu a je adaptabilní k různým podmínkám. Nevýhodou je citlivost na toxické účinky některých sloučenin [55].

### 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1 Použité přístroje, pomůcky a chemikálie

##### *Přístroje a pomůcky*

- Analytické váhy Boeco, SRN
- Centrifuga Sigma Laborzentrifugen, SRN
- HPLC/PDA/UV-VIS, ThermoFisher Scientific, Ultimate 3000, USA
- HPLC/UV-VIS, ThermoFisher Scientific, Finnigan SURVEYOR, USA
- Sonda Corneometer® CM 825
- Sonda Tewameter® TM 300
- Spektrofotometr VIS, Helios δ, Unicam, GB
- Systém MPA 5, Courage + Khazaka, SRN
- TRACE GC/FID, ThermoQuest S.p.A, Itálie
- Třepačka IKA Yellow Line, SRN
- Ultrazvuková lázeň PS 02000, ČR
- Vakuová odparka RV 06, IKA, SRN
- Vodní lázeň EL-20, Merci a.s., ČR
- Vortex, TK35, Kartell spa, USA
- Vortex, TK35, Kartell spa, USA

##### *Chemikálie*

- ABTS, Sigma Aldrich, SRN
- Acetonitril, p.a., LachNer, ČR
- Dodecylsírán sodný, p.a., LachNer, ČR
- Diethylether, p.a., LachNer, ČR
- Dusitan sodný, p.a., Lachema, ČR
- Ethanol, p.a., LachNer, ČR
- Ethanol, pro UV-VIS, Lachema, ČR
- Fenol, p.a., LachNer, ČR
- Folin-Ciocalteu činidlo, Serva, SRN
- Glukosa monohydrát, p.a., LachNer, ČR
- Hydroxid draselný, p.a., LachNer, ČR
- Hydroxid sodný, p.a., LachNer, ČR
- Chlorid hlinitý, p.a., LachNer, ČR
- Chlorid sodný, p.a., Lachema, ČR
- Chloroform, VWR Chemicals BDH PROLABO, USA
- Katechin, Sigma Aldrich, SRN
- Krémový základ Cremor basalis, Fagron, USA
- Kyselina L-askorbová, Sigma Aldrich, SRN
- Kyselina chlorovodíková (35%), LachNer, ČR
- Kyselina gallová, Sigma Aldrich, SRN
- Kyselina metafosforečná, Lachema, ČR
- Kyselina sírová (96%), LachNer, ČR
- Methanol, p.a., Lachema, ČR
- Octan sodný, p.a., LachNer, ČR
- Peroxodisírán draselný, p.a., Sigma Aldrich, SRN

- $\alpha$ -tokoferol, Sigma Aldrich, SRN
- Trolox, Sigma Aldrich, SRN
- Uhličitan sodný, p.a., LachNer, ČR

Všechny ostatní indikátory, činidla a katalyzátory byly zapůjčeny v laboratoři.

### 3.2 Příprava vzorků pro analýzu

#### *Vzorky bez fermentace*

Pro práci byl poskytnut materiál z meruňkového sadu v Pozořicích (320 m n. m.) nacházejících se nedaleko Brna, na okraji Dražanské vrchoviny. Byly sklizeny pouze padané plody v průběhu měsíce července a srpna roku 2015. Z meruňek byly průběžně vyjímány pecky, sušené v loubkovém plochém koši ve stínu po dobu 3 měsíců. Celkem bylo naloženo přibližně 150 litrů máče a z něj získáno asi 2 kg pecek.

V srpnu 2015 byly pecky mechanicky narušeny pomocí rotačního louskáčku a jádra byla vybírána ručně. Tímto způsobem vznikl vzorek MJ – jádra s obaly z nefermentovaných meruňkových pecek. Část vzorku MJ byla lisována na lisu výrobce Farnet s.r.o. na farmě v Mikulově. Výtěžek oleje byl přibližně 0,5 dcl – vzorek MO. Odpad po lisování jader, pokrutina – MP. Shrnutí nalezneme v Tabulce 4.

*Tabulka 4: Řada vzorků bez fermentace*

Označení vzorku	Materiál
<b>MJ</b>	jádra s obaly z nefermentovaných meruňkových pecek
<b>MO</b>	olej z nefermentovaných jader
<b>MP</b>	pokrutina z nefermentovaných jader

Vzorek MJ a MP byly uloženy do papírových sáčků a vzorek MO byl nalit do suché, čisté sklenice a hermeticky uzavřen. Vzorky byly skladovány v temné místnosti se stabilní teplotou 14 °C.

U vzorku MO došlo po čase k sedimentaci kalu, a tudíž k rozdělení vrstev. Obsah vzorku byl velice malý, protože vrstva kalu činila zhruba 50 % celkového objemu.

Všechny vzorky, které nebyly vystaveny procesu fermentace, můžeme vidět na Obr. 11.



*Obr. 11: Řada vzorků bez fermentace: meruňková jádra (vlevo), olej z meruňkových jader (uprostřed) a pokrutina (vpravo)*



### *Vzorky po fermentaci*

Pro tyto vzorky byly poskytnuty meruňkové pecky z pěstitelské pálenice v Citonicích, okres Znojmo. Sběr meruňkových plodů byl proveden na konci srpna 2015. Pecky byly ponořeny do meruňkového mače, připraveného pro pálení ovocného meruňkového destilátu. Proces fermentace trval 8 týdnů. Po celou dobu fermentace byly pecky ponořeny v tekutině bez přístupu vzduchu.

Po ukončení procesu fermentace byly pecky odseparovány z meruňkového mače mechanickým separátorem a vysypány na hromadu. Pecky nepodstoupily ohřívání v kotli. Ve stejný den byly rozhrnuty na betonové ploše a sušeny pod přímým sluncem. Sušení probíhalo 4 dny, dokud se na betonové ploše nepřestala dělat vlhká místa. Pecky byly rozhrnuty do tenké vrstvy a průběžně prohrabávány a obraceny. Přes noc byly sklizeny pod střechu. Po sušení byly pecky uloženy do jutových vaků, o objemu asi 40 kg, a skladovány na betonové podlaze pod střechou.

V průběhu měsíce září byly pecky mechanicky narušeny rotačním louskáčkem. Díky ponoření pecek do mírně slané vody došlo k odseparování vyloupaných jader a skořápek. Jádra byla ihned posbírána pomocí síta a nechala se sušit ve stínu po dobu dvou dnů. Takto vznikl vzorek FMJ – fermentovaná meruňková jádra. Část vzorku byla opět lisována na lisu výrobce Farmet s.r.o. na farmě v Mikulově. V tomto případě byl výtěžek oleje zhruba 3 dcl – vzorek FMO. Z odpadu po lisování, pokrutiny, vznikl vzorek FMP. Shrnutí můžeme vidět v Tabulka 5.

*Tabulka 5: Řada vzorků po fermentaci*

Označení vzorku	Materiál
<b>FMJ</b>	jádra s obaly z fermentovaných meruňkových pecek
<b>FMO</b>	olej z fermentovaných pecek
<b>FMP</b>	pokrutina z jader po fermentaci

Vzorky byly skladovány stejným způsobem jako vzorky bez fermentace. U vzorku FMO byla opět pozorována sedimentace kalu, došlo k oddělení průhledné vrstvy oleje.

Na Obr. 12 můžeme vidět získané vzorky po fermentaci.



*Obr. 12: Řada vzorků po fermentaci: meruňková jádra (vlevo), meruňkový olej (uprostřed) a pokrutina (vpravo)*

### Porovnání vzorků

V Tabulka 6 nalezneme popis a porovnání jader před fermentací a po fermentačním procesu.

Tabulka 6: Porovnání vlastností jader před a po fermentačním procesu

VZOREK	MJ	FMJ
Vzhled	oblý, gumovitý	oblý, gumovitý
Vlastnost	samostatné oddělení slupky	samostatné oddělení slupky
Velikost po sušení	40 % z původních čerstvých jader	40 % z původních čerstvých jader
Barva	bílá, pololesklá	skelně bílá, pololesklá
Chuť	stejná jako u čerstvých jader	mírně kyslá

Tabulka 7 znázorňuje charakterizaci a porovnání oleje z čerstvých jader a oleje z meruňkových jader po kvašení.

Tabulka 7: Porovnání olejů z meruňkových jader

VZOREK	MO	FMO
Vlastnost	vytvoření 3 jasně oddělených vrstev	vytvoření 2 jasně oddělených vrstev
Barva	1. vrstva (usazenina) = tmavě hnědá až zelená (tloušťka cca 50 %) 2. vrstva = světle okrová (tloušťka cca 30 %) 3. vrstva (olej) = průhledná, nažloutlá (tloušťka cca 20 %)	1. vrstva (usazenina) = tmavě hnědá až zelená (tloušťka cca 30 %) 2. vrstva = světle okrová (tloušťka cca 70 %)
Chuť	olejnatá, příjemná	nakyslá

Srovnání vlastností pokrutiny čili odpadu při výrobě oleje, můžeme pozorovat v Tabulka 8.

Tabulka 8: Porovnání vlastností pokrutiny před a po kvašení

VZOREK	MP	FMP
Barva	okrovo-hnědá	okrovo-hnědá
Struktura	drobivá, mastná	drobivá, mastná, hrudkovitá

### Zakoupené vzorky

Z důvodu nedostatečného množství dodaného oleje z meruňkových jader bez fermentace byl pro přípravu krémů zakoupen meruňkový olej značky Saloos, který můžeme vidět na Obr. 13. U tohoto oleje nebyla pozorována žádná sedlina kalu, což je zřejmě způsobeno větší úpravou oleje po výrobě např. filtrací. Olej měl po celém objemu stejnou konzistenci i barvu, která byla trochu světlejší než u dodaných olejů. Olej je rovněž vyroben lisováním za studena, čili nedošlo k žádné chemické ani tepelné úpravě a zachování původní chutě i vůně.





Obr. 13: Meruňkový olej Saloos

### 3.3 Izolace lipidů-Folchova metoda

U izolace lipidů z meruňkových jader je nutné, aby nejprve došlo k odstranění vazeb a následné hydrolýze. Pro tento postup byla zvolena Folchova metoda. Nejprve proběhla mechanická homogenizace, následovala vlastní extrakce tuků na rozhraní dvou nemísitelných kapalných fází a poté došlo k odpaření organického rozpouštědla (chloroformu). Celkové množství lipidů bylo nakonec stanoveno gravimetricky [40], [58].

Navážka 1 g vzorku (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP, viz Kapitola 3.2) byla homogenizována s malým množstvím mořského písku. Ke zhomogenizovanému vzorku bylo postupně přidáno 40 ml extrakční směsi, Folchovo činidlo (chloroform: metanol v poměru 2:1), následně byla směs kvantitativně převedena do Erlenmayerovy baňky a umístěna 1 hodinu na třepačce, aby proběhla extrakce. Směs byla přefiltrována přes hladký filtr, pevný podíl se vrátil zpět do Erlenmajerovy baňky a bylo přidáno 25 ml Folchova činidla. Opět následovala extrakce na třepačce po dobu 30 minut a přefiltrování směsi. Ke kapalným podílům obou směsí byla přidána destilovaná voda v poměru přibližně 1:1. Směs bylo nutné odstředit při 3 500 ot/min po dobu 10 minut, aby došlo k oddělení fází. Spodní chloroformová vrstva byla odpipetována do předem zvážené, suché slzičkové baňky. Následovalo odpaření chloroformu na vakuové odparce a dosušení v exsikátoru. Po vysušení byl stanoven obsah tuku gravimetricky.

### 3.4 Stanovení tukových čísel

Stanovení tukových čísel, číslo kyselosti, zmýdelnění, esterové a jodové číslo, slouží k charakterizaci vlastnosti tuku [40].

#### *Číslo kyselosti*

Do menší kádinky byl navážen 1 g meruňkového oleje (vzorky MO, FMO). Pomocí 25 ml etanolu byla navážka kvantitativně převedena do titrační baňky. Směs byla přivedena k varu a následně k ní byly přidány 3 kapky indikačního činidla, fenolftaleinu. Za horka byla směs titrována odměrným roztokem 0,1 M hydroxidem draselným do růžového zbarvení, které bylo stálé 30 sekund. Zároveň byl proveden slepý pokus pouze s 25 ml etanolu.

#### *Číslo zmýdelnění*

Do menší kádinky bylo naváženo 2 g oleje (vzorky MO, FMO). Navážka byla kvantitativně převedena prostřednictvím 25 ml KOH do destilační baňky, byly přidány varné kuličky a směs se nechala zmýdelňovat po dobu 30 minut pod zpětným chladičem na topném hnízdě. Až bylo

dosaženo čirosti vzorku, přidaly se do něj za horka 3 kapky indikátoru-fenolftaleinu a ihned byl titrován odměrným roztokem 0,5 M kyselinou chlorovodíkovou do odbarvení indikátoru. Současně byl proveden slepý pokus stejným postupem bez vzorku.

### ***Jodové číslo***

Do malé kádinky bylo naváženo asi 0,3 g oleje (vzorky MO, FMO). Navážka byla kvantitativně převedena do zábrusové Erlenmayerovy baňky pomocí 10 ml chloroformu. K roztoku bylo napipetováno 25 ml jodmonobromidového roztoku a baňka byla uzavřena zábrusovou zátkou ovlhčenou v roztoku KI, aby byl zadržen unikající jod. Obsah baňky byl promíchán lehkým krouživým pohybem a bez přístupu světla, za občasného promíchání, se nechal stát 1 hodinu. Paralelně byl připraven slepý pokus bez navážky oleje. Po hodině se zátky opláchly destilovanou vodou do baněk a do každé baňky bylo přidáno 25 ml KI odměrným válcem. Po 1–2 minutách se ke směsi přidalo 100 ml destilované vody. Poté proběhla titrace odměrným roztokem thiosíranem sodným do žlutého zbarvení dle Rovnice (4). Následně byly ke směsi přidány 3–5 ml škrobového mazu a titrovalo se do odbarvení vodné fáze. V případě zbarvení spodní chloroformové fáze do fialova, musela být směs protřepána a dotitrována. Chloroformová vrstva smí být zbarvena pouze rozpuštěným tukem do nažloutlého až hnědého zbarvení.



## **3.5 Stanovení methylesterů mastných kyselin plynovou chromatografií**

### ***Příprava methylesterů mastných kyselin***

Postup přípravy methylesterů mastných kyselin byl proveden dle normy ČSN EN ISO 5509. K navážce 0,5 g meruňkového oleje (vzorky MO, FMO) bylo přidáno 5 ml hexanu. Poté bylo do vialky, ze směsi, pipetou odebráno 0,5 ml, přidáno opět 5 ml hexanu a 0,5 ml 2 M roztoku KOH v metanolu. Směs byla intenzivně protřepávána po dobu přibližně 8 minut a následně se nechala 6 minut odstát pro oddělení vrstev. Z horní hexanové fáze byl odebrán 1 ml vzorku ke GC-FID analýze.

### ***Podmínky separace GC-FID analýzy***

- Plynový chromatogram TRACE GC (ThermoQuestS p.A., Itálie).
- Plamenově ionizační detektor (FID), 250 °C, průtok vodíku: 35 ml/min, průtok vzduchu: 350 ml/min, make-up dusíku: 30 ml/min.
- Dávkování: autosampler bez děliče toku (1 µl), ventil uzavřen po dobu 5 minut.
- Teplota injektoru: 250 °C
- Nosný plyn: dusík s průtokem 0,5 ml/min.
- Kapilární kolona: DB-23 o rozměrech 60 m × 0,25 mm × 0,25 µm.
- Teplotní program: 60 °C, 10 minut, vzestupný gradient 12 °C/min do 200 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 5 °C/min do 220 °C s výdrží 15 min, vzestupný gradient 10 °C/min do 240 °C s výdrží 7 min.
- Celková doba analýzy: 60 minut.

## **3.6 Stanovení celkových sacharidů dle Duboise**

Jak již bylo zmíněno v Kapitole 2.3.4, při stanovení celkových sacharidů metodou dle Duboise, se pro dehydrataci sacharidů používá koncentrovaná kyselina sírová. Následuje

kondenzace furfuralu s fenolem a vzniklé barevné kondenzáty se nakonec stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm [44].

Nejprve byla sestavena kalibrační křivka glukosy o koncentraci (10–100) µg/ml. K navážce 0,01 g vzorku (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP) bylo přidáno 10 ml kyseliny chlorovodíkové, směs se nechala hydrolyzovat po dobu 24 hodin. Do zkumavky byl napipetován 1 ml hydrolyzovaného vzorku, 1 ml 5% fenolu a 5 ml kyseliny sírové. Směs se za občasného promíchání na vortexu nechala 30 minut stát, poté se na 15 minut vložily zkumavky do ultrazvuku. Nakonec proběhlo měření absorpance směsi při 490 nm pomocí UV-VIS spektrofotometru. Současně byl proveden slepý pokus bez vzorku.

### 3.7 Stanovení vlákniny dle Henneberga a Stohmana

Princip metody je uveden v Kapitole 2.3.5. Jelikož jsou pro tuto metodu nutné poměrně velké navážky, nebyl obsah vlákniny stanoven u vzorku MJ (nefermentovaná meruňková jádra), z důvodu nedostatku tohoto vzorku.

Do 500 ml destilační baňky bylo naváženo (2–3) g vzorku (vzorky MP, FMJ, FMP). K vzorku bylo přidáno 200 ml 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, směs se nechala vařit po dobu 30 minut pod zpětným chladičem. Poté byla provedena filtrace horkého roztoku přes filtrační kelímek. Zbytek ve filtračním kelímku byl zpět kvantitativně převeden do destilační baňky pomocí 200 ml NaOH a znovu se nechala 30 minut vařit pod zpětným chladičem.

### 3.8 Stanovení obsahu bílkovin dle Kjeldahla

Kjeldahlova metoda je univerzální metodou pro stanovení celkového dusíku v běžných potravinách či potravinových surovinách, viz Kapitola 2.3.6. Z celkového obsahu dusíku se výpočtem stanoví obsah hrubé bílkoviny dle Rovnice (5). Kde  $c_{\text{H}_2\text{SO}_4}$  je koncentrace kyseliny sírové,  $V_{\text{H}_2\text{SO}_4}$  je objem kyseliny sírové v předloze,  $c_{\text{NaOH}}$  je koncentrace hydroxidu sodného,  $V_{\text{NaOH}}$  je objem hydroxidu sodného a  $m_{\text{VZ}}$  je hmotnost navážky vzorku. Celá rovnice je vynásobena univerzálním faktorem 6,25 [41].

Nejprve dochází k mineralizaci vzorku. Do mineralizačních trubic byl navážen 1 g vzorku (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP), bylo přidáno 10 ml koncentrované kyseliny sírové a 2 g Weiningerova katalyzátoru (90 g síranu sodného, 7 g síranu rtuťnatého, 1,5 g síranu měďnatého a 1,5 g selenu) a následně se trubice vložily do mineralizačního bloku, kde se nechaly mineralizovat po dobu 24 hodin. Mineralizace je ukončena, jakmile je vzorek čirý.

Mineralizát vzorku byl rozpuštěn v destilované vodě a kvantitativně převeden do destilační baňky, zároveň bylo přidáno pár kapek indikačního činidla-fenolftaleinu. Během celé reakce bylo přidáváno dělicí nálevkou 40 ml 33% hydroxid sodný. Uvolněný amoniak se predestiloval vodní parou do předlohy s 25 ml standardizovaného roztoku kyseliny sírové. Po 25 minutách destilace byla předloha snížena tak, aby konec chladiče nezasahoval do roztoku a destilace probíhala ještě 5 minut. Následně byly k roztoku přidány 3 kapky Tashirova indikátoru a titrovalo se odměrným roztokem NaOH do žlutého zbarvení.

$$\text{HB} = \frac{14,01 \cdot 2 \cdot \left[ \left( c_{\text{H}_2\text{SO}_4} \cdot V_{\text{H}_2\text{SO}_4} \right) - \left( \frac{c_{\text{NaOH}} \cdot V_{\text{NaOH}}}{2} \right) \right]}{m_{\text{VZ}}} \cdot 6,25 \quad (5)$$

### 3.9 Stanovení antioxidační aktivity metodou TEAC

Pro stanovení antioxidační aktivity lze využít řadu metod. Jednou z nejzákladnějších a nejpoužívanějších je metoda TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity), která je založena na testování schopnosti vzorku zhaset kation-radikál ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Stanovení probíhá pomocí UV-VIS spektrofotometrie při vlnové délce 734 nm, kdy dochází ke sledování úbytku absorbance v čase. Výsledná antiradikálová aktivita vzorku je srovnávána s antiradikálovou aktivitou syntetické látky Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina) [59].

Nejprve byla provedena extrakce. Navážka 0,04 g vzorku (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP) byla smíchána s 2 ml 60% roztoku etanolu, a poté se směs nechala inkubovat v lázni při 60 °C 1 hodinu. Po uplynutí 1 hodiny byly ependorfky se směsí vloženy do centrifugy na 5 minut, při 4 °C a 1500 ot/min, pro sedimentaci tuhého podílu vzorku.

Před samotným měřením bylo nutné připravit kation-radikál ABTS<sup>•+</sup>. Do odměrné baňky o objemu 10 ml, bylo množství ABTS rozpuštěno v destilované vodě tak, aby bylo dosaženo koncentrace 7 mM. Následně byl do odměrné baňky přidán peroxodisíran draselný o koncentraci 2,45 mM a baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku. Odměrnou baňku bylo potřeba obalit alobalem a uložit do tmavého místa, aby nedošlo k reakci se světlem, při pokojové teplotě 12 hodin. Po uplynutí této doby, byl kation-radikál ABTS<sup>•+</sup> zředěn etanolem pro UV-VIS tak, aby byla výsledná absorbance tohoto zásobního roztoku, měřená při 734 nm,  $0,700 \pm 0,02$ . Jako blank byl použit čistý etanol pro UV-VIS. Pro zjištění absorbance v čase nula ( $A_0$ ) byl do zúžené kyvety napipetován 1 ml připraveného zásobního roztoku a 10 µl destilované vody. Následovalo měření samotných vzorků. Opět byl do zúžené kyvety napipetován 1 ml zásobního roztoku ABTS<sup>•+</sup>, ale místo destilované vody, bylo přidáno 10 µl vzorku. Směs byla promíchána a ponechána v tmavém místě 10 minut. Po uplynutí této doby, byl měřen pokles absorbance ( $A_1$ ).

Spektrofotometrické měření absorbancí probíhalo při vlnové délce 734 nm. Výsledná absorbance byla stanovena na základě rozdílu  $A_0$  a  $A_1$ .

Pro kalibraci byl připraven zásobní roztok Troloxu o koncentraci 400 µg/ml tak, že navážka 40 mg byla rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce 60% roztokem etanolu pro UV-VIS. Koncentrační řada byla připravena v rozmezí (0–400) µg/ml. Měření probíhalo obdobně, jako u měření samotných vzorků. Namísto vzorku byl použit roztok standardu Troloxu a místo destilované vody, pro zjištění absorbance v čase nula, byl použit 60% roztok etanolu pro UV-VIS. Jako slepý vzorek byl rovněž použit 60% roztok etanolu pro UV-VIS.

### 3.10 Stanovení celkových polyfenolů

Metoda stanovení je založena na redukční reakci Folin-Ciocalteova činidla (roztok wolframových a molybdenových oxidů) s polyfenoly za vzniku modrého zbarvení, které lze následně spektrofotometricky stanovit při vlnové délce 750 nm. Intenzita zbarvení se odvíjí od koncentrace polyfenolů přítomných ve vzorku [60].

Navážka zhruba 0,04 g vzorku (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP) byla smíchána s 2 ml 60% roztoku etanolu, a poté se směs nechala inkubovat v lázni při 60 °C 1 hodinu, aby došlo k extrakci. Po hodině byly ependorfky se směsí vloženy do centrifugy na 5 minut, při 4 °C a 1500 ot/min, pro sedimentaci tuhého podílu vzorku.

Nejprve byla provedena kalibrace, kde byla jako standard použita kyselina gallová o koncentraci (0–1) mg/ml. Do zkumavky byly napipetovány 2 ml Folin-Ciocalteova činidla, 2 ml destilované vody a 100  $\mu$ l vzorku. Směs byla promíchána pomocí vortexu a nechala se 5 minut odstát. Následně byly přidány 2 ml nasyceného roztoku  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , opět byla směs promíchána a ponechána 15 minut odstát. Nakonec proběhlo měření absorbance při vlnové délce 750 nm pomocí UV-VIS spektrofotometrie. Současně byl připraven i slepý pokus, kde se místo vzorku do směsi přidalo 100  $\mu$ l destilované vody.

### 3.11 Stanovení celkových flavonoidů

Metoda stanovení celkových flavonoidů se odvíjí od barevné změny roztoku s hlinitou solí. Dochází ke vzniku oranžovo-žlutých komplexů, vyvolaných právě přítomností flavonoidů, které lze spektrofotometricky detekovat při vlnové délce 510 nm [61].

Postup úpravy vzorků (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP) byl totožný jako v Kapitole 3.10.

Nejprve byla provedena kalibrace, pro kterou byl použit jako standard katechin o koncentracích (0–50)  $\mu$ g/ml. Do zkumavky byl napipetován 1 ml vzorku, 3 ml destilované vody a 0,4 ml  $\text{NaNO}_2$ . Směs byla promíchána na vortexu a nechala se 5 minut odstát. Ke směsi bylo přidáno 0,4 ml chloridu hlinitého, opět došlo k promíchání a po 5 minutovém odstátí se přidaly 3 ml hydroxidu sodného a 2 ml destilované vody. Směs byla naposledy promíchána a po 15 minutách bylo provedeno měření absorbance pomocí UV-VIS spektrofotometrie, při vlnové délce 510 nm. Současně byl připraven i slepý pokus pouze s destilovanou vodou.

### 3.12 Stanovení vitamínu C (kyseliny askorbové) metodou HPLC

Kyselina askorbová patří do skupiny vitamínů rozpustných ve vodě, což jsme se mohli dočíst v Kapitole 2.2.6. Jedná se o nepříliš stabilní látku, a z tohoto důvodu je nutné využít k její extrakci kyselinu metafosforečnou, jejíž přítomností v roztoku dochází ke stabilizaci vitamínu C. Jako nejvhodnější analytická metoda používaná pro stanovení kyseliny askorbové se ukázala vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) [62].

Nejprve byla provedena kalibrace za použití roztoku kyseliny L-askorbové o koncentračním rozmezí (0–50) mg/l. Navážka 1 g vzorku (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP) byla rozetřena pomocí mořského písku a 5 ml 2% roztoku kyseliny metafosforečné. Směs se nechala stát po dobu 10 minut, aby došlo k extrakci vitamínu C. Následně byl odebrán kapalný podíl směsi, který se dal odstředit při 14 000 ot. na 3 minuty. Horní část byla přefiltrována přes jednorázový filtr a ihned nastříknuta na kolonu.

HPLC analýza probíhala za izokratických podmínek a použití kolony Zorbax Eclipse C18- $\text{NH}_2$  o rozměrech 4,6 mm  $\times$  150 mm  $\times$  5  $\mu$ m. Mobilní fázi tvořila směs 0,05 M octanu sodného a acetonitrilu, která byla v poměru 95:5. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,6 ml/min, objem dávkovací smyčky 20  $\mu$ l a teplota separace 30 °C. Ukončení analýzy proběhlo pomocí spektrofotometrické detekce při vlnové délce 254 nm.

### 3.13 Stanovení vitamínu E ( tokoferolu) metodou HPLC

Jak již bylo zmíněno v Kapitole 2.2.6, vitamín E patří mezi vitamíny rozpustné v tucích a jeho nejaktivnější forma je  $\alpha$ -tokoferol. Stanovení této formy tokoferolu v potravinách lze provést různými metodami, jako například spektrofotometrickými, kolorimetrickými nebo i chromatografií na tenké vrstvě. Tyto metody mají však určitá omezení, jsou časově náročné

a nejsou moc přesné. Jako nejúčinnější se prokázala kapalinová chromatografie (HPLC). Tato metoda se běžně používá, jak pro identifikaci, tak pro stanovení koncentrace tokoferolu [63].

Nejprve byla provedena kalibrace za použití standardního roztoku  $\alpha$ -tokoferolu o koncentraci (0–1) mg/ml. Navážka 1 g vzorku (vzorky MO a FMO) byla kvantitativně převedena do odpařovací misky a bylo k ní přidáno 10 ml metanolickeho roztoku hydroxidu draselneho. Tento roztok byl připraven rozpuštením 10 g KOH ve 20 ml destilované vody a následným kvantitativním převedením do 100 ml odměrné baňky, kde byl směsný roztok doplněn metanolem po rysku.

Odpařovací miska se směsí byla vložena do termostatu, kde byla ponechána při 80 °C zhruba 40 minut, aby došlo ke zmýdelnění. Zmýdelněný vzorek byl rozmíchán v destilované vodě a diethyletheru. Směs byla převedena do Erlenmayerovy baňky, kde došlo k extrakci. Horní organická fáze byla odpipetována do baňky a následně odpařena prostřednictvím vakuové odparky. Aby bylo možné nastříknout vzorek na kolonu, bylo nutné rozpustit odparek v 1 ml metanolu pro HPLC.

Pro HPLC analýzu byly zvoleny izokratické podmínky za použití kolony Kinetex C18 s parametry 4,6 mm × 150 mm × 2,6  $\mu$ m. Jako mobilní fáze byl zvolen metanol s průtokem 1 ml/min. Teplota separace byla 30 °C a objem dávkovací smyčky 20  $\mu$ l. HPLC analýza byla ukončena UV-VIS detekcí při vlnové délce 295 nm.

### **3.14 Stanovení sušiny sušením**

Tato metoda je nejpoužívanější na stanovení obsahu vody v potravinářských produktech. Vhodně upravený vzorek se vysuší do konstantní hmotnosti a následně se zváží [41].

Hliníkové misky i s odkrytými víčky byly nejprve vysušeny při 105 °C v sušárně, nechaly se vychladnout v exsikátoru a i s víčkem byly zváženy. Do misek byly rychle naváženy 3 g vzorku (vzorky MJ, MP, FMJ, FMP), a byly vloženy do sušárny, kde se sušila při 105 °C zhruba 3 hodiny. Poté byly misky uzavřeny víčkem, ponechány v exsikátoru kvůli vychladnutí a zváženy. Následně byly misky se vzorkem umístěny opět do sušárny na 30 minut a po vychladnutí zváženy. Tento postup byl opakován, dokud nebyl rozdíl mezi posledními dvěma váženími menší než 2 mg.

### **3.15 Příprava a účinky krémů z meruňkového oleje**

Nejprve byly z vybraných vzorků olejů připraveny krémy o různé koncentraci olejové složky. Následně, po jejich aplikaci na pokožku, byla testována schopnost hydratace pokožky a zabraňování transepidermální ztráty vody (TEWL). Měření bylo provedeno přístrojem MPA 5, pomocí korneometru a tewametru, viz Kapitola 2.4. Na Obr. 14 můžeme vidět sondy s přístrojem.



Obr. 14: Přístroj MPA 5 a sonda tewametru (vlevo) a korneometru

### **Příprava krémů**

Na přípravu krémů byl použit krémový základ Cremor basalis, jehož složení nalezneme v Tabulka 9. Krémový základ neobsahuje žádné běžné konzervanty (např. parabeny, sorbáty, apod.), je typem emulze olej ve vodě a má vyrovnaný podíl těchto fází. Vyznačuje se ambifilními vlastnostmi umožňující zapracovat do sebe látky hydrofilního i lipofilního charakteru [64].

Do krémového základu byly vmíchány oleje, a to, fermentovaný olej (vzorek FMO) a z důvodu nedostatečného množství dodaného meruňkového oleje (vzorek MO), byl pro porovnání použit kupovaný meruňkový olej značky Saloos, viz Kapitola 3.2. Zmíněné oleje byly přidány v určitém množství tak, aby připravené krémy měly výslednou koncentraci 3% a 5%. Do plastového kelímku bylo nejprve naváženo potřebné množství oleje, ke kterému byl následně přimíchán krémový základ tak, aby výsledná hmotnost krému byla 10 g. Takto připravené krémy můžeme vidět na Obr. 15.

Tabulka 9: Složení krémového základu Cremor basalis

Složka	Množství (g/100 g)
Glyceroli monostearas	4,0
Alcohol cetylicus	6,0
Triglycerida saturata media	7,5
Vaselinum album	25,5
Macrogol 20 glyceroli monostearas	7,0
Propylenglycolum	10,0
Aqua purificata	40,0



*Obr. 15: Připravené krémy*

Krémy byly následně naplněny do injekčních stříkaček, i včetně čistého krémového základu a uloženy do exsikátoru pro další použití.

#### ***Měření hydratace a transepidermální ztráty vody***

Pro experiment byla sestavena skupina pěti probandů ve věku 23–24 let. Experiment probíhal po dobu dvou dnů vždy ve stejné místnosti a při stejné teplotě.

Před zahájením měření hydratace a TEWL bylo nutné připravit 0,5% roztok SDS (dodecylsírán sodný) ve fyziologickém roztoku (0,9% roztok NaCl ve vodě) pro odmaštění pokožky. Do roztoku byly pomocí pinzety máčeny proužky filtračního papíru o rozměrech  $1,5 \times 4$  cm a přikládány na vnitřní stranu předloktí pravé i levé ruky. Na obě ruce bylo celkem přiloženo 6 proužků, které byly přelepeny náplastí, aby nedošlo k odpařování roztoku, viz Obr. 16. Odmašťování pokožky probíhalo 2 hodiny.



*Obr. 16: Odmašťování pokožky na vnitřní straně předloktí*

Připravené krémy i čistý krémový základ Cremor Basalis byly naplněny do injekčních stříkaček o objemu 5 ml a vloženy do exsikátoru. Po dvou hodinách odmašťování pokožky byly odstraněny náplasti a proužky filtračního papíru. Plochy pod filtračním papírem byly označeny



fixem a proměřeny sondami. Následně byly, na označená místa, nanесeny a rovnoměrně rozetřeny krémy, připravené v injekčních stříkačkách, o objemu 0,2 ml, viz Obr. 17.



Obr. 17: Předloktí po aplikaci krémů

Pořadí nanášení krémů, které začalo vždy od levého předloktí, můžeme pozorovat v Tabulka 10.

Tabulka 10: Pořadí aplikace krémů

Pořadí	Vzorek
1	pouze odmaštěná pokožka (pro kontrolu měření)
2	čistý krémový základ
3	3% krém z fermentovaného oleje
4	5% krém z fermentovaného oleje
5	3% krém z kupovaného oleje Saloos
6	5% krém z kupovaného oleje Saloos

Po aplikaci krémů byla označená místa proměřována sondami pro korneometr a tewametr vždy po 2, 4 a 24 hodinách u každého z probandů.

### 3.16 Testování Genotoxicity-SOS Chromotest

Testování genotoxicity meruňkových olejů (vzorky MO a FMO) bylo provedeno souběžně se zpracováním bakalářské práce Michaely Ručkové, která se zabývala tématem: *Využití buněčných kultur k testování přírodních látek rostlinného původu.*

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Izolace lipidů-Folchova metoda

Na základě porovnání metod z Kapitoly 2.3.1 a nastudované literatury byla pro izolaci lipidů zvolena právě Folchova metoda, která se ukázala jako nejvhodnější pro naše vzorky. V Tabulce 11 můžeme pozorovat výsledky stanovení množství tuků v jednotlivých vzorcích (viz Kapitola 3.2). Stanovení bylo u každého vzorku provedeno celkem třikrát a z dílčích výsledků byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí programu Excel. Obsah lipidů v jednotlivých vzorcích byl přepočítán na 100 g suroviny pro lepší porovnání s deklarovanými hodnotami.

*Tabulka 11: Výsledky stanovení izolace lipidů v jednotlivých vzorcích*

VZOREK	MJ	MP	FMJ	FMP
Obsah lipidů (g/100 g)	29,17 ± 0,26	31,31 ± 0,14	34,51 ± 0,40	31,30 ± 0,35

Již v Kapitole 2.2.1 bylo uvedeno, že deklarovaný obsah lipidů v meruňkových jádrech, resp. olejnatost semen, se pohybuje v rozmezí (43–53) %. Deklarované hodnoty pro množství lipidů v pokrutině se nám bohužel nepodařilo nikde najít. Z Tabulky 11 můžeme vyčíst, že se nám podařilo z čistých meruňkových jader vyizolovat 29,17 g, z nefermentované pokrutiny 31,31 g, z meruňkových jader po fermentaci pak 34,51 g a z pokrutiny po fermentaci 31,30 g na 100 g suroviny. Naše výsledky jsou značně nižší než deklarované hodnoty, což mohlo být způsobeno nedostatečnou extrakcí a také tím, že obsah lipidů se odvíjí především od odrůdy meruňky a olejnatosti semen, tudíž deklarované hodnoty uváděné v odborné literatuře nemusí být úplně přesné.

Z Tabulky 11 můžeme také vyčíst, že obsah lipidů u nefermentovaných jader je nižší než u jader po fermentaci. Hodnoty u nefermentované i fermentované pokrutiny jsou přibližně stejné. V Kapitole 4.10 najdeme stanovení obsahu sušiny a vlhkosti v jednotlivých vzorcích, což úzce souvisí právě se stanovením množství lipidů. Platí pravidlo, že čím je obsah tuku v materiálu větší, tím je menší množství vody a naopak. Toto pravidlo odpovídá i obsahu lipidů v meruňkových jádrech a v jádrech fermentovaných. Jak již bylo zmíněno, odchylka může být způsobena druhem materiálu a také samotným získáváním daných olejů.

### 4.2 Stanovení tukových čísel

Stanovení lipidových čísel určuje vlastnosti tuku, což jsme zmínili už v Kapitole 2.4. Patří zde číslo zmydlnění, kyselosti a dále esterové a jodové číslo.

Stanovení tukových čísel proběhlo u nefermentovaného oleje a oleje po fermentaci (vzorky MO a FMO). Všechna stanovení byla provedena celkem třikrát, z jednotlivých výsledků byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka rovněž za použití programu Excel. Veškeré výsledky můžeme vidět v Tabulce 12.

*Tabulka 12: Výsledky stanovení tukových čísel ve vzorcích olejů*

VZOREK	Číslo zmydlnění	Číslo kyselosti	Esterové číslo	Jodové číslo
MO	169,26 ± 0,34	53,33 ± 0,99	115,92 ± 1,32	97,43 ± 0,32
FMO	177,73 ± 0,90	59,38 ± 0,16	118,35 ± 1,06	98,62 ± 0,49

V Tabulka 13 můžeme pozorovat deklarované hodnoty, které jsou uváděné v odborné literatuře. Uvedené hodnoty jsou pouze pro olej z nefermentovaných meruňkových jader, pro olej po fermentaci nebyly bohužel hodnoty k dohledání. Také můžeme z tabulky pozorovat, že se zde nenachází hodnota pro esterové číslo, a to proto, že esterové číslo se stanovuje pouze z rozdílu čísla zmýdelnění a čísla kyselosti.

Tabulka 13: Deklarované hodnoty tukových čísel pro meruňkový olej [18], [65]

	Číslo zmýdelnění	Číslo kyselosti	Jodové číslo
<b>Meruňkový olej</b>	161,58–178,72	2,27–2,58	95–110

Z obou tabulek můžeme vyčíst, že námi stanovené hodnoty čísla zmýdelnění se pohybují v rozmezí standardních hodnot. Pro olej z nefermentovaných jader (vzorek MO) je tato hodnota 169,26 a pro olej z jader po fermentaci (vzorek FMO) 177,73 mg hydroxidu draselného, potřebného k neutralizaci volných i vázaných mastných kyselin v 1 g tuku. Číslo zmýdelnění tudíž udává obsah veškerých mastných kyselin ve vzorku. Toto tvrzení je doloženo v následující kapitole (4.3), kde se můžeme dočíst, že obsah mastných kyselin u vzorku po fermentaci je skutečně vyšší než u vzorku bez fermentace.

Dále bylo stanoveno číslo kyselosti, které bylo u vzorku MO, čili nefermentovaného oleje stanoveno na 53,33 a u vzorku FMO, oleje z jader po fermentaci, na 59,39 mg KOH. Toto množství je potřebné k neutralizaci 1 g tuku a lze z něj odvodit množství volných mastných kyselin. V obou tabulkách můžeme vidět, že se naše hodnoty od těch standardních značně liší a že hodnota u vzorku po fermentaci je vyšší než u oleje bez úpravy. Meruňkový olej po fermentaci tedy obsahuje větší množství volných mastných kyselin než olej, který nebyl vystaven fermentačnímu procesu. Chyba mohla pravděpodobně vzniknout již při výrobě olejů (viz Kapitola 3.2) nebo jejich dlouhodobým skladováním. Při nesprávném skladování mohlo dojít k oxidaci meruňkových olejů. Již výše jsme se mohli dočíst, že číslo kyselosti charakterizuje také kvalitu jedlých tuků. V našem případě, tudíž podle všeho, vzniklo jakési znehodnocení těchto olejů.

Již bylo zmíněno výše, že esterové číslo je stanoveno pouze z rozdílu hodnot čísla zmýdelnění a čísla kyselosti. Lze z něj však vypočítat i další údaj, a to, procentuální zastoupení glycerolu v tuku. V Tabulka 12 můžeme vidět, že esterové číslo je určeno ve vzorku MO na 115,92 a ve vzorku FMO na 118,35 mg KOH, které je potřebné k neutralizaci estericky vázaných kyselin v 1 g tuku. Z těchto hodnot byl tedy vypočítán i přibližný procentuální obsah glycerolu v tuku podle Rovnice (6) [41].

$$\% \text{ glycerolu} = 0,0547 \cdot \check{C}_e \quad (6)$$

V oleji z nefermentovaných meruňkových jader (vzorek MO) se nachází 6,34 % glycerolu a v oleji z jader po fermentaci (vzorek FMO) pak 6,47 % glycerolu. Stanovené hodnoty esterového čísla mohou být zkresleny špatným určením čísla kyselosti, jelikož, jak jsme už mohli dočíst, čísla kyselosti našich vzorků neodpovídají deklarovaným hodnotám.

Jako poslední bylo stanoveno jodové číslo, které u vzorku MO nabývá hodnoty 97,43 a u vzorku FMO 98,62 g jodu, které se aduje na 100 g tuku. I pohledem do Tabulka 13 můžeme říci, že se tyto hodnoty pohybují v rozmezí standardních hodnot uváděných v odborné literatuře. Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.3.2, toto číslo udává množství dvojných vazeb čili množství nenasycených mastných kyselin v tuku. Tento fakt potvrzuje i Obr. 19 v Kapitole 4.3, na kterém

můžeme pozorovat, že se v meruňkovém oleji po fermentaci nachází opravdu velké množství nenasycených mastných kyselin.

### 4.3 Obsah mastných kyselin

Identifikace a obsah mastných kyselin byl stanoven metodou GC-FID (viz 3.5). Obsah mastných kyselin byl stanoven u obou vzorků celkem dvakrát, a to, ihned po obdržení vzorků a následně po roce skladování. V Tabulka 14 jsou uvedené výsledky z obou stanovení mastných kyselin i jejich deklarované hodnoty z odborné literatury. U obou vzorků bylo vypočítáno pouze procentuální zastoupení mastných kyselin s největším obsahem. Výpočet byl proveden pomocí standardů pro GC analýzu, které zahrnují retenční časy, koncentrace a plochy píků methylesterů mastných kyselin za optimálních podmínek.

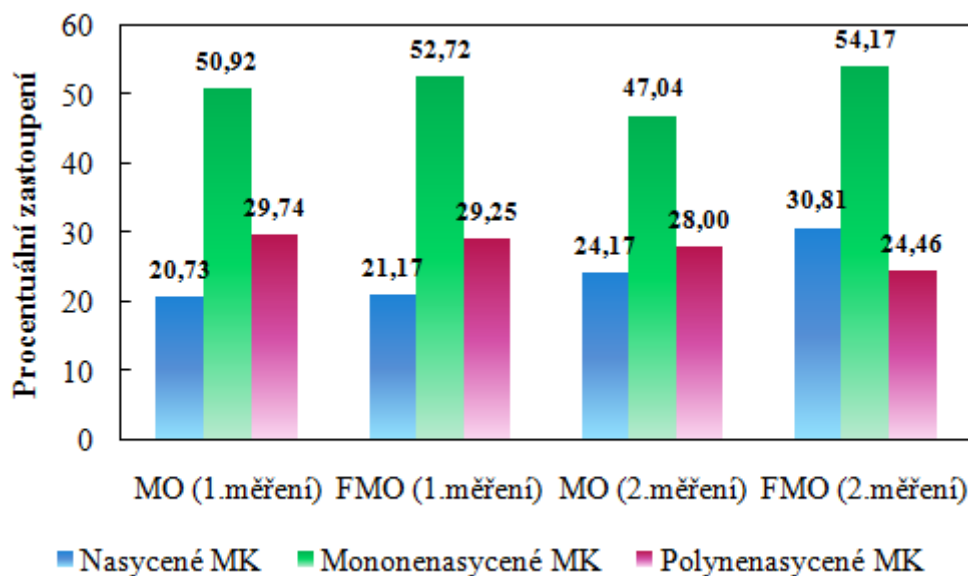
Tabulka 14: Obsah mastných kyselin v meruňkovém oleji [66], [67]

VZOREK	MO		FMO		Deklarované hodnoty (%)
Mastná kyselina	1. měření	2. měření	1. měření	2. měření	
Olejová (%)	48,25	43,53	49,77	42,78	56–70
Linolová (%)	29,14	25,49	28,73	21,04	22–30
Palmitová (%)	13,16	12,39	15,10	12,14	3–8

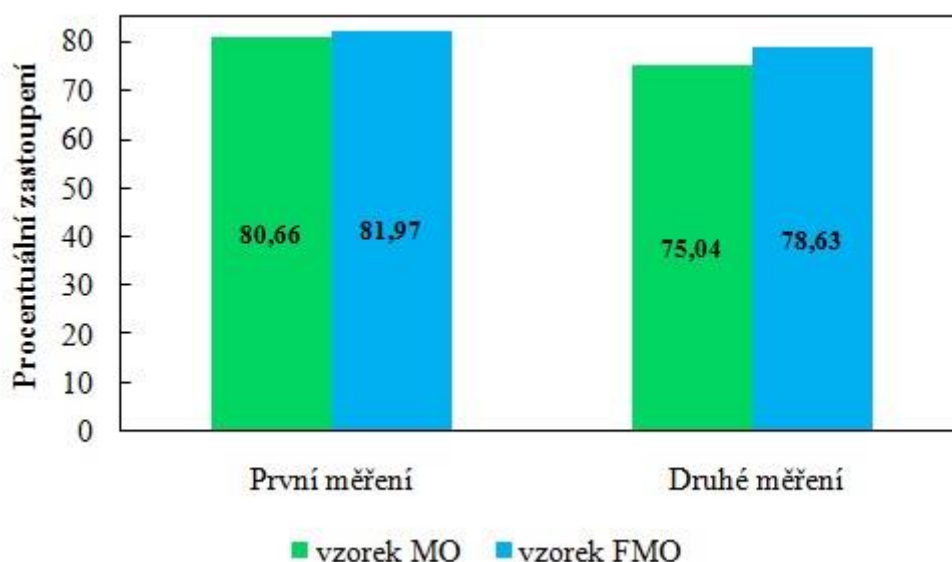
Pohledem na hodnoty v Tabulka 14 vidíme, že obsah mastných kyselin našich vzorků se nepohybuje v rozmezí standardních hodnot, a to ani po měření vzorků ihned po obdržení (1. měření). Po prvním měření se v oleji bez fermentace (vzorek MO) nacházelo 48,25% kyseliny olejové, 29,14% kyseliny linolové a 13,16% kyseliny palmitové. Zbýlých 9,45% tvoří ostatní, převážně nasycené mastné kyseliny (např. stearová, myristová, pentadekanová, apod.). Množství těchto tří mastných kyselin v oleji po fermentaci (vzorek FMO) byly lehce vyšší než u vzorku MO. Bylo zde 49,77 % kyseliny olejové, 28,73 % kyseliny linolové a 15,10 % kyseliny palmitové, zbylých 6,40 % tvoří opět ostatní, převážně nasycené mastné kyseliny. Oba profily mastných kyselin nalezneme v příloze této práce (viz Příloha 1 a Příloha 2).

Po ročním skladování obou olejů (viz 2. měření) byl obsah mastných kyselin ve vzorku MO stanoven na 43,53 % kyseliny olejové, 25,49 % kyseliny linolové a 12,39 % kyseliny palmitové. Zbývajících 18,59 % bylo opět tvořeno zbylými mastnými kyselinami. Ve vzorku FMO se nacházelo 42,78 % kyseliny olejové, 21,04 % kyseliny linolové a 12,14 % kyseliny palmitové. Zbylé mastné kyseliny tvoří 24,04 %. Porovnání procentuálního zastoupení mastných kyselin nalezneme na Obr. 18. Z kterého můžeme vyčíst, že celkově jsou nejvíce zastoupené mononenasycené mastné kyseliny, kde patří kyselina olejová a dále např. kyselina myristoolejová a palmitoolejová. Z Tabulka 14 i grafu je patrné, že celkově, obsahy zmíněných mastných kyselin po ročním skladování mírně poklesly.

Nicméně, jak můžeme vidět z Obr. 19, u oleje po fermentaci se celkově nachází větší množství nenasycených MK než u oleje bez tohoto procesu, což dokazuje i Jodové číslo stanovené v Kapitole 4.2.



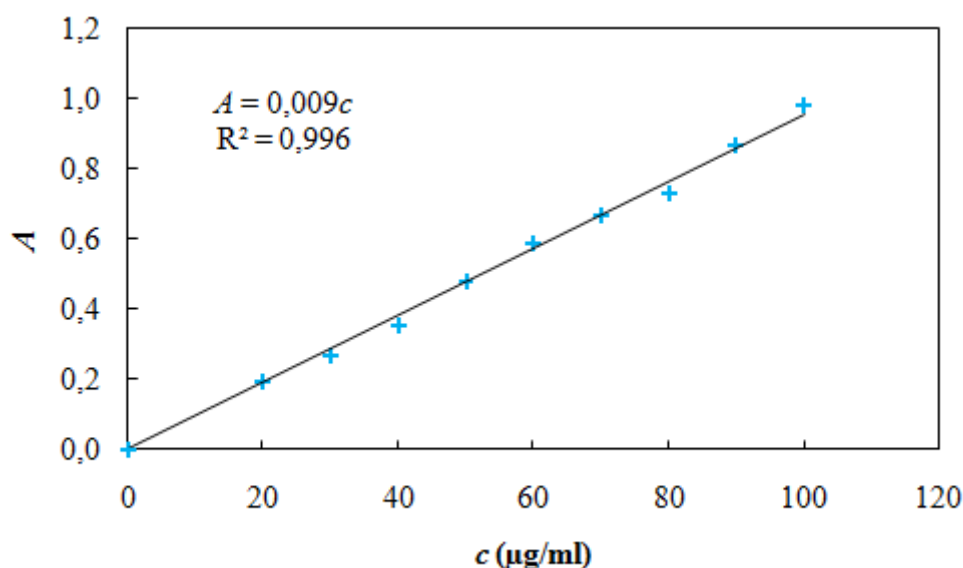
Obr. 18: Procentuální zastoupení mastných kyselin v meruňkovém oleji



Obr. 19: Obsah nenasycených mastných kyselin

#### 4.4 Obsah celkových sacharidů

Na základě porovnání metod (z Kapitoly 2.3.4) a nastudované literatury, byla pro stanovení celkových sacharidů vybrána právě spektrofotometrická Duboisova metoda, která se zdála být pro naše vzorky nejoptimálnější. Měření absorbance, proběhlo u každého vzorku celkem třikrát a následně byl z dílčích výsledků vypočítán průměr, který byl dosazen do rovnice lineární regrese kalibrační přímky glukosy, kterou nalezneme na Obr. 20. Tímto způsobem byl vypočítán obsah celkových sacharidů v jednotlivých vzorcích a směrodatná odchylka. Výsledné hodnoty byly vztaženy na 100 g suroviny a můžeme je vidět v Tabulka 15.



Obr. 20: Kalibrační křivka glukosy

Tabulka 15: Obsah sacharidů v jednotlivých vzorcích

VZOREK	MJ	MP	FMJ	FMP
Obsah sacharidů (g/100 g)	11,20 ± 0,22	9,19 ± 0,52	5,33 ± 0,27	5,15 ± 0,10

Deklarované hodnoty pro množství sacharidů v meruňkových jádrech se pohybují v rozmezí hodnot (7–14) % (viz Kapitola 2.2.2), pro pokrutiny a jádra po fermentaci se nám bohužel nepodařilo standardní hodnoty nikde nalézt. Pohledem do Tabulka 15 vidíme, že obsah sacharidů v meruňkových jádrech bez fermentace (vzorek MJ) je 11,20 % a odpovídá tak danému rozmezí deklarovaných hodnot. Množství sacharidů u vzorku FMJ činí 5,33 % a je značně menší než u vzorku MJ, což je v pořádku, jelikož při procesu fermentace slouží sacharidy jako hlavní zdroj energie pro mikroorganismy. Stejně je to i u vzorku MP a FMP. V pokrutině, která nebyla vystavena procesu fermentace je obsah celkových cukrů 9,19 % a v pokrutině po fermentaci pak 5,15 %. Odchylka ve stanovení může být způsobena materiálem, jelikož vzorky před fermentací byly z jiné oblasti než vzorky po fermentaci, tudíž na to mohly mít vliv i klimatické podmínky, doba sběru, úprava materiálu po sklizni apod. To, že se celkově v pokrutině nachází menší množství sacharidů, než v jádrech je pravděpodobně způsobeno změnou složení, resp. 1 g jádra nemusí odpovídat složení 1 g pokrutiny, jelikož se jedná o odpad při výrobě oleje-vylisovaný koláč.

#### 4.5 Obsah vlákniny

Stanovení vlákniny se provádí chemickými a enzymovými metodami, z nichž je nejrozšířenější právě Hennebergova-Stohmanova metoda, viz Kapitola 2.3.5. Jelikož jsou pro tento postup vyžadovány poměrně velké navážky vzorku, bylo stanovení provedeno pouze dvakrát u vzorků MP, FMJ a FMP. Z dílčích výsledků byl vypočítán průměr a směrodatná odchylka, výsledné hodnoty byly přepočítány na 100 g materiálu a jsou uvedeny Tabulka 16. Vláknina nebyla vůbec stanovena u vzorku MJ, protože jsme tohoto vzorku neměli dostatek.



Tabulka 16: Obsah vlákniny v jednotlivých vzorcích

VZOREK	MP	FMJ	FMP
Obsah vlákniny (g/100 g)	9,71 ± 0,44	4,74 ± 0,17	6,02 ± 0,14

V odborné literatuře uvádí standardní hodnoty pro množství vlákniny v jádrech 5,4 % a v pokrutině (7–10,8) % [18]. Pro vzorky po fermentaci opět nemáme deklarované hodnoty k dispozici. Z Tabulka 16 můžeme vyčíst, že se v jádrech po fermentaci nachází 4,74 % vlákniny, což nemůžeme porovnat se standardní hodnotou, protože ta je uvedena pro jádra bez fermentace. Nemůžeme ani říct, zda je tato hodnota správná v porovnání s obsahem vlákniny ve vzorku MJ, jelikož jak již bylo zmíněno, z důvodu malého množství materiálu nebylo stanovení u tohoto vzorku provedeno. Z daných deklarovaných hodnot však můžeme odvodit, že hodnoty pro jádra jsou menší než pro pokrutinu. Ve vzorku MP je 9,71 % vlákniny a ve vzorku FMP pak 6,02 %. Protože jsou celkové hodnoty množství vlákniny větší u pokrutin, můžeme se pouze domnívat, že pro vzorek MJ byla tato hodnota ještě větší než u FMJ. Množství vlákniny, v jednotlivých vzorcích, mohl také ovlivnit kmen mikroorganismu použitý pro fermentaci. Některé kmeny MO potřebují mít v živném médiu právě vlákninu K případným chybám, mohlo dojít i při neopatrném sušení a vážení díky velké hygroskopičnosti vlákniny.

#### 4.6 Obsah bílkovin

Stanovení bílkovin bylo provedeno pomocí Kjeldahlovy metody, jejíž postup nalezneme v Kapitole 3.8. U všech vzorků proběhl tento postup celkem třikrát a následně byl proveden výpočet obsahu pomocí Rovnice (5). Pomocí programu Excel byl z dílčích výsledků vypočítán průměr a směrodatná odchylka pro porovnání s deklarovanými hodnotami. V Tabulka 17 můžeme vidět výsledky u jednotlivých vzorků, kde jsou uvedená množství vztažena na 100 g suroviny.

Tabulka 17: Množství bílkovin v jednotlivých vzorcích

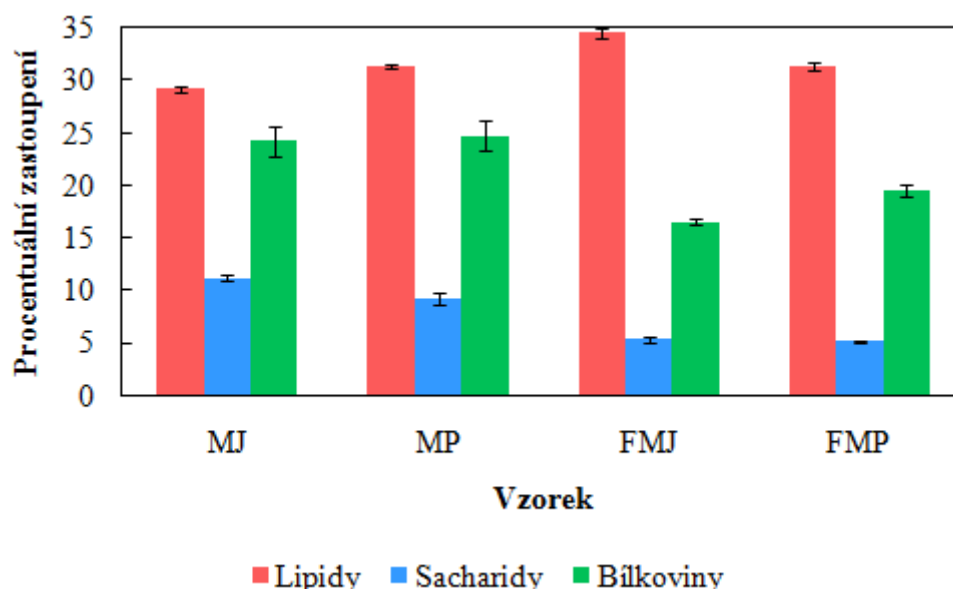
VZOREK	MJ	MP	FMJ	FMP
Obsah bílkovin (g/100 g)	24,22 ± 1,46	24,76 ± 1,51	16,54 ± 0,33	19,52 ± 0,55

Standardní hodnoty obsahu bílkovin, uváděné v odborné literatuře, by měly být v rozmezí hodnot (23–27) % pro meruňková jádra bez fermentace. Pohledem na hodnoty v Tabulka 17 zjistíme, že množství bílkovin v meruňkových jádrech (vzorek MJ) je 24,22 % a skutečně se pohybuje v rozmezí deklarovaných hodnot. Ve vzorku FMJ bylo množství stanoveno na 16,54 %. Proteiny, jakožto dusíkaté látky, jsou nutné pro živé organismy k zajištění životních funkcí. Bílkoviny jsou složeny z aminokyselin, které obsahují ve své struktuře amino ( $-NH_2$ ) skupinu, tudíž slouží mikroorganismům jako zdroj dusíkatých látek. Proto by měl být obsah bílkovin po fermentaci menší než před tímto procesem, stejně jako u sacharidů.

Porovnáním hodnot množství proteinů v pokrutinách zjistíme, že obsah bílkovin ve vzorku MP je 24,76 % a je větší než obsah ve vzorku FMP, kde se nachází 19,52 % bílkovin. Jak již bylo zmíněno, u stanovení sacharidů, odchylka v měření mohla být způsobena materiálem, respektive změnou složení jednotlivých vzorků.

Na Obr. 21 můžeme vidět, jak procentuální množství proteinů v jednotlivých vzorcích, tak, pro porovnání, také obsahy lipidů a sacharidů. Tyto biologicky aktivní látky patří mezi nejdůležitější složky potravy a díky nim je i meruňkový olej tak prospěšný pro lidský

organismus. Z obrázku je patrné, že proces fermentace výrazně snížil množství sacharidů i proteinů. Největší zastoupení lipidů se nachází v meruňkových jádrech po fermentaci, zatímco ve zbytku vzorků je toto množství přibližně stejné. Obsah proteinů v jádrech i v pokrutině bez fermentace se pohybuje přibližně ve stejných hodnotách. Největší zastoupení sacharidů je v nefermentovaných jádrech, pak v pokrutině a přibližně stejné pak ve vzorcích po fermentaci. Jak již bylo zmíněno, jednotlivé hodnoty se také odvíjejí od odrůdy meruněk a klimatických podmínek pěstování.



Obr. 21: Procentuální zastoupení základních nutričních hodnot v jednotlivých vzorcích

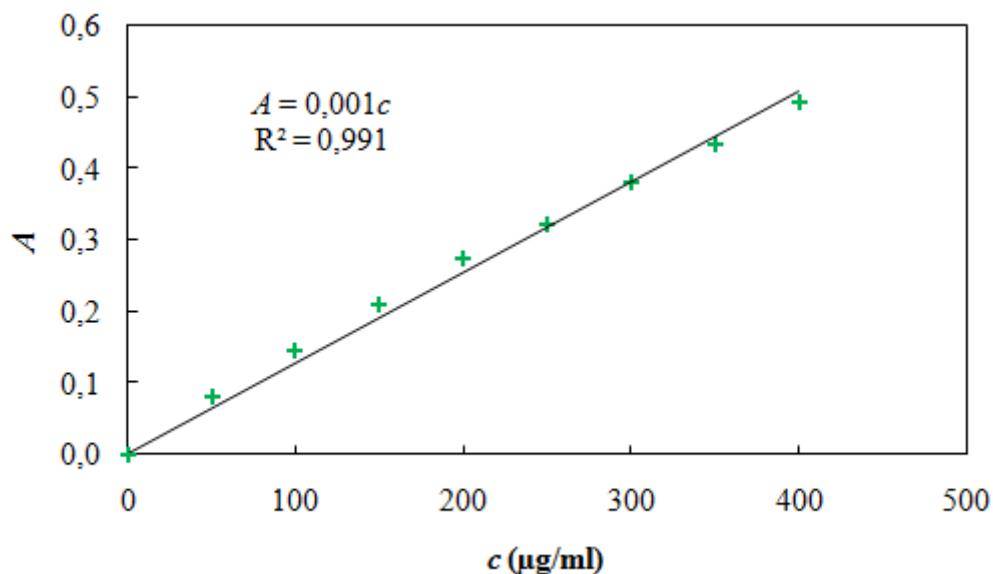
#### 4.7 Antioxidační aktivity

Antioxidační aktivita byla stanovena u vzorků MJ, MP, FMJ a FMP dle postupu uvedeném v Kapitole 3.9. Měření absorbance proběhlo u každého vzorku celkem třikrát a následně byl z těchto hodnot vypočítán průměr. Výsledná koncentrace byla získána dosazením průměrné absorbance do rovnice regrese kalibrační křivky, kterou můžeme vidět na Obr. 22. Antioxidační aktivita je nakonec vyjádřena v ekvivalentech standardu, Troloxu. Konečné hodnoty byly přepočítány na 1 g suroviny, rovněž byla pomocí Excelu vypočítána i směrodatná odchylka a výsledek můžeme vidět v Tabulka 18.

Tabulka 18: Antioxidační aktivita jednotlivých vzorků

VZOREK	MJ	MP	FMJ	FMP
Antioxidační aktivita (mg TEAC/g)	2,40 ± 0,001	6,87 ± 0,004	6,44 ± 0,005	7,09 ± 0,005





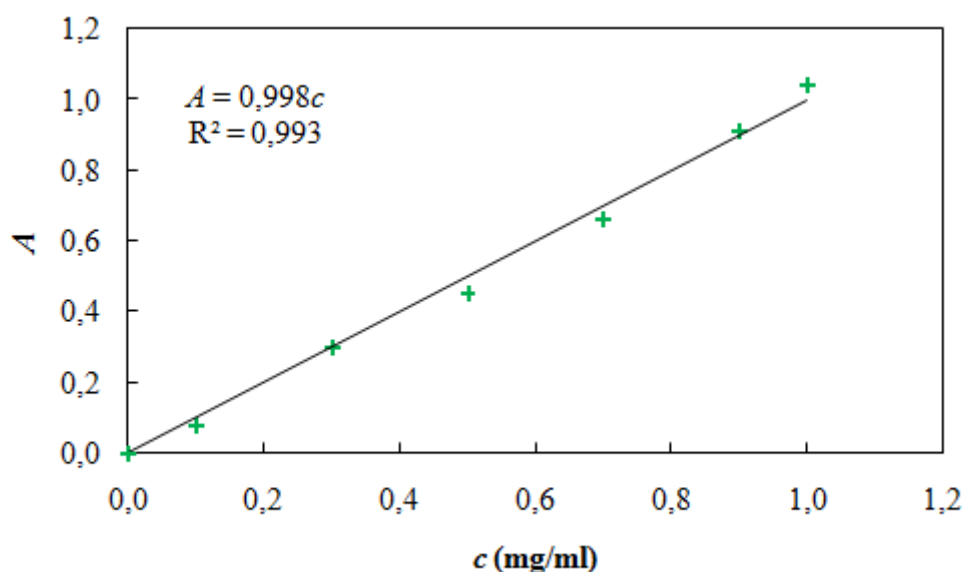
Obr. 22: Kalibrační křivka Troloxu

Pohledem do Tabulka 18 zjistíme, že nejvyšší antioxidační aktivita 7,09 mg/g je fermentované meruňkové pokrutiny (vzorek FMP). Hodnoty u vzorku FMJ a MP jsou přibližně stejné a nejmenší antioxidační aktivitu vykazují meruňková jádra bez fermentace (vzorek MJ). Tento fakt je doložen i v následující kapitole (4.8), kde byl stanoven celkový obsah polyfenolů a flavonoidů, jakožto základních antioxidačních látek. Kde jsou obsahy těchto látek také nejvyšší u vzorku FMP, dále hodnoty u vzorků FMJ a MP jsou přibližně stejné a nejméně těchto sloučenin se nachází ve vzorku MJ.

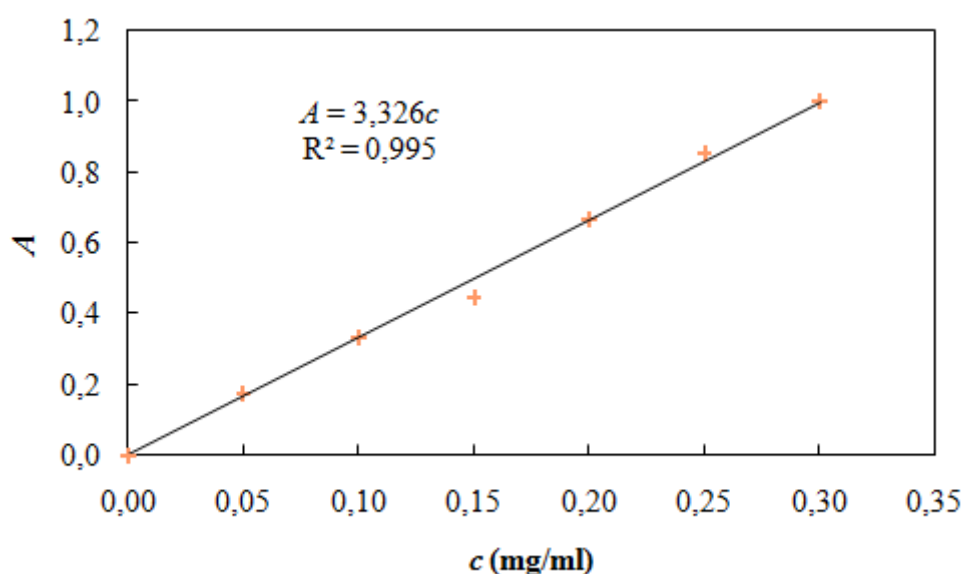
Chyba v měření mohla být způsobena při úpravě vzorku-extrakci, kdy nemuselo dojít k dokonalému uvolnění z jednotlivých vzorků.

#### 4.8 Obsah celkových polyfenolů a flavonoidů

Stanovení polyfenolů i flavonoidů proběhlo na základě měření absorbance na UV-VIS spektrofotometru, celý postup nalezneme v Kapitolách 3.10 a 3.11. U každého vzorku bylo měření absorbance opakováno třikrát a z jednotlivých hodnot byl vypočítán průměr. Pro zjištění výsledné koncentrace polyfenolů i flavonoidů byly tyto hodnoty dosazeny do kalibračních křivek katechinu a kyseliny gallové, které můžeme vidět na Obr. 23 a Obr. 24. Koncentrace byla přepočítána na 1 g vzorku a rovněž byla vypočtena směrodatná odchylka. Konečné hodnoty můžeme vidět v Tabulka 19.



Obr. 23: Kalibrační křivka katechinu



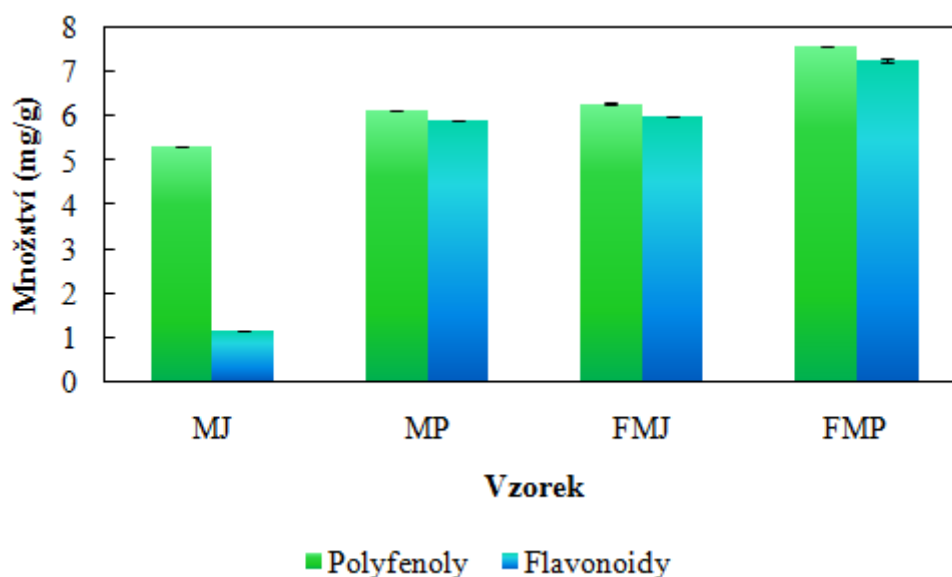
Obr. 24: Kalibrační křivka kyseliny gallové

Tabulka 19: Výsledné hodnoty celkových polyfenolů a flavonoidů

VZOREK	MJ	MP	FMJ	FMP
<b>Polyfenoly (mg/g)</b>	5,34 ± 0,0057	6,15 ± 0,0040	6,29 ± 0,0021	7,59 ± 0,0036
<b>Flavonoidy (mg/g)</b>	1,17 ± 0,0022	5,91 ± 0,0009	5,99 ± 0,0090	7,27 ± 0,0482

Z Tabulka 19 je patrné, že obsah polyfenolů i flavonoidů je nejmenší u čistých jader, kde se nachází 5,34 mg/g polyfenolů a 1,17 mg/g flavonoidů. U nefermentované pokrutiny a fermentovaných jader jsou množství polyfenolů i flavonoidů přibližně stejná, pohybují se okolo hodnoty 6 mg/g. Největší obsah těchto látek je pak v pokrutině po fermentaci, kde je 7,59 mg/g polyfenolů a 7,27 mg/g flavonoidů. Porovnání hodnot u jednotlivých vzorků nalezneme na Obr. 25. I přesto, že pro obsah polyfenolů a flavonoidů v meruňkových jádrech

se nám nepodařilo najít standardizované hodnoty, můžeme tato množství potvrdit také stanovením antioxidační aktivity (viz Kapitola 4.7). V předešlé kapitole se totiž můžeme dočíst, že nejvyšší antioxidační aktivitu vykazuje právě fermentovaná pokrutina, dále fermentovaná meruňková jádra a meruňková pokrutina, a nakonec meruňková jádra bez fermentace.



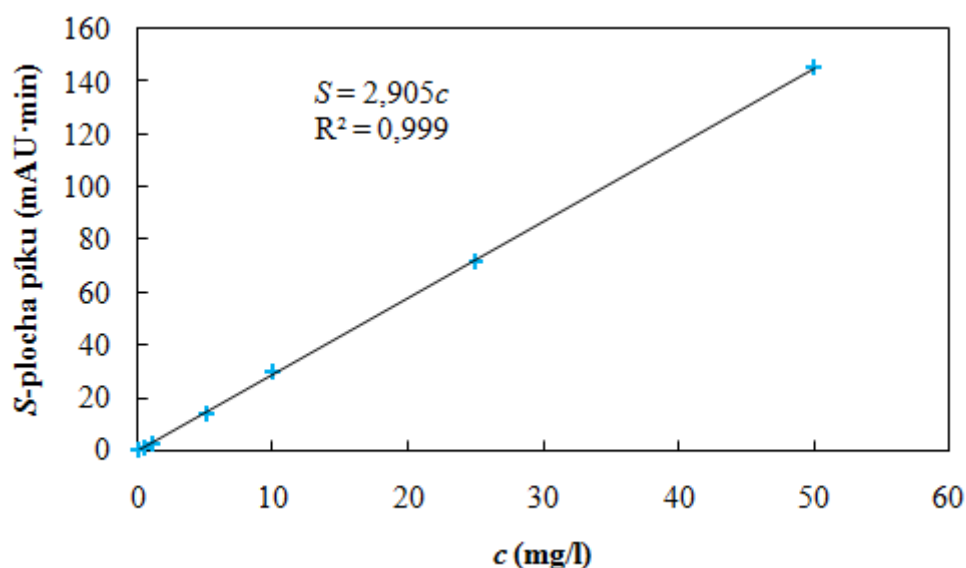
Obr. 25: Obsah polyfenolů a flavonoidů v jednotlivých vzorcích

Případné chyby ve stanovení by mohly být způsobeny při úpravě vzorku (viz Kapitola 3.10), kdy nemuselo dojít k dostatečné extrakci, což mohlo výrazně ovlivnit výsledné hodnoty. Na stanovení může mít také vliv materiál vzorků, jelikož jak již bylo zmíněno výše, vzorky před a po fermentaci byly dodány z jiné oblasti, tudíž na to může mít vliv druh meruňky a také klimatické podmínky, doba sběru a skladování.

#### 4.9 Obsah kyseliny askorbové a tokoferolu

Obě stanovení proběhla pomocí metody HPLC, ale s odlišnými podmínkami separace, což bylo zmíněno již v Kapitolách 3.12 a 3.13.

Kyselina askorbová byla stanovována u obou typů jader i pokrutiny. Vyhodnocení obsahu vitamínu C bylo provedeno pomocí softwaru Chromeleon Local a kalibrační křivky kyseliny L-askorbové, kterou můžeme vidět na Obr. 26.



Obr. 26: Kalibrační křivka kyseliny L-askorbové

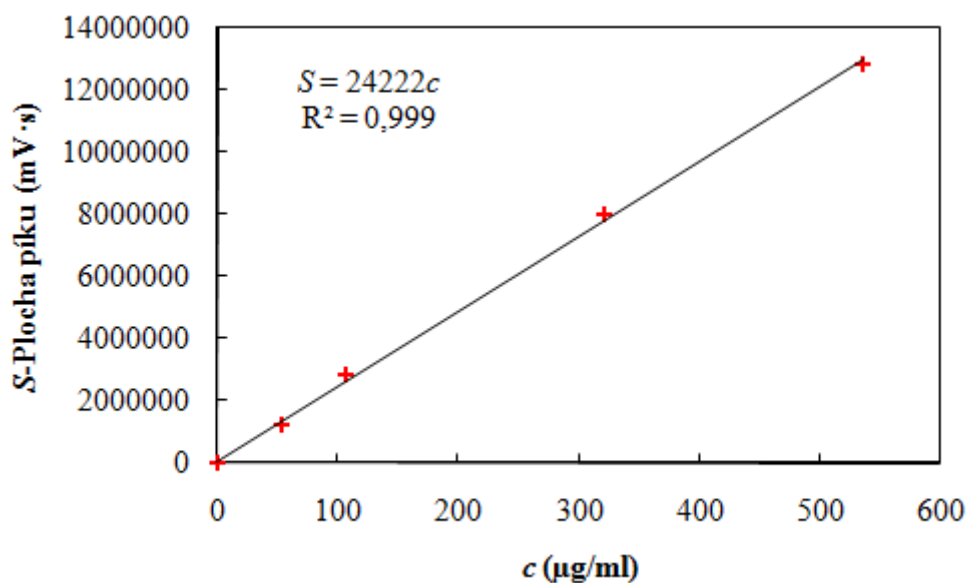
Výsledné množství bylo následně přepočítáno na 1 g vzorku. Hodnoty jsou uvedeny v Tabulka 20.

Tabulka 20: Koncentrace kyseliny askorbové v jednotlivých vzorcích

VZOREK	MJ	MP	FMJ	FMP
Obsah vitamínu C (mg/g)	nedetekovatelné	nedetekovatelné	0,07	nedetekovatelné

Z Tabulka 20 je patrné, že vitamín C se podařilo, i po opakovaném měření, detekovat pouze ve vzorku FMJ, čili v meruňkových jádrech po fermentaci, kde se nachází 0,07 mg/g kyseliny askorbové. I takto malé množství vitamínu C výrazně přispívá k celkové antioxidační aktivitě, protože jak už bylo zmíněno v Kapitole 2.2.6, v případě tohoto vitamínu se jedná o významnou antioxidační látku. V ostatních vzorcích se nepodařilo detekovat jakékoliv množství kyseliny askorbové. Chyba v měření mohla být pravděpodobně způsobena tím, že v případě vitamínu C se jedná o velice nestabilní látku, která snadno degraduje, a po přípravě vzorku nebylo v dostatečné době uskutečněno měření.

Jak již bylo uvedeno, stanovení tokoferolu proběhlo rovněž metodou HPLC. Vitamín E byl stanoven v meruňkovém oleji, jak před fermentací, tak po tomto procesu. Pro výpočet množství této látky byla použita kalibrační křivka  $\alpha$ -tokoferolu, kterou můžeme vidět na Obr. 27.



Obr. 27: Kalibrační křivka  $\alpha$ -tokoferolu

Jelikož jsou získaná množství poměrně malá, byla přepočítána na 1 g suroviny. Množství tokoferolu v meruňkovém oleji můžeme vidět v Tabulka 21.

Tabulka 21: Množství tokoferolu v meruňkovém oleji

VZOREK	MO	FMO
Obsah tokoferolu ( $\mu\text{g/g}$ )	5,87	328,20

Deklarované hodnoty množství tokoferolu v meruňkovém oleji, uváděné v odborné literatuře se pohybují v rozmezí (268,5–436)  $\mu\text{g/g}$  oleje. Pohledem do Tabulka 21 můžeme vidět, že množství vitamínu E v oleji z meruňkových jader bez fermentace je 5,87  $\mu\text{g/g}$ , a tudíž je výrazně nižší než obsah v oleji po fermentaci, kde se nachází 328,20  $\mu\text{g/g}$  a také tato hodnota vůbec neodpovídá standardizovaným hodnotám. Ani přesto, že analýza tokoferolu byla provedena u každého vzorku třikrát, jsme nedosáhli jiných hodnot. Množství tokoferolu mohlo být ovlivněno špatným skladováním vzorku, protože pravděpodobně nebylo dokonale zabráněno přístupu světla a mohlo dojít k jeho oxidaci. U oleje už nepůsobí synergický efekt, o kterém jsme se mohli dočíst v Kapitole 2.2.6, tudíž nedochází k regeneraci tokoferolu vitamínem C, což také mohlo ovlivnit detekci této látky. Chybu mohl také způsobit nesprávný postup samotné výroby těchto olejů, kdy při lisování jader nemuselo dojít k uvolnění vitamínu E, jelikož je pevně vázán v membráně.

#### 4.10 Obsah sušiny

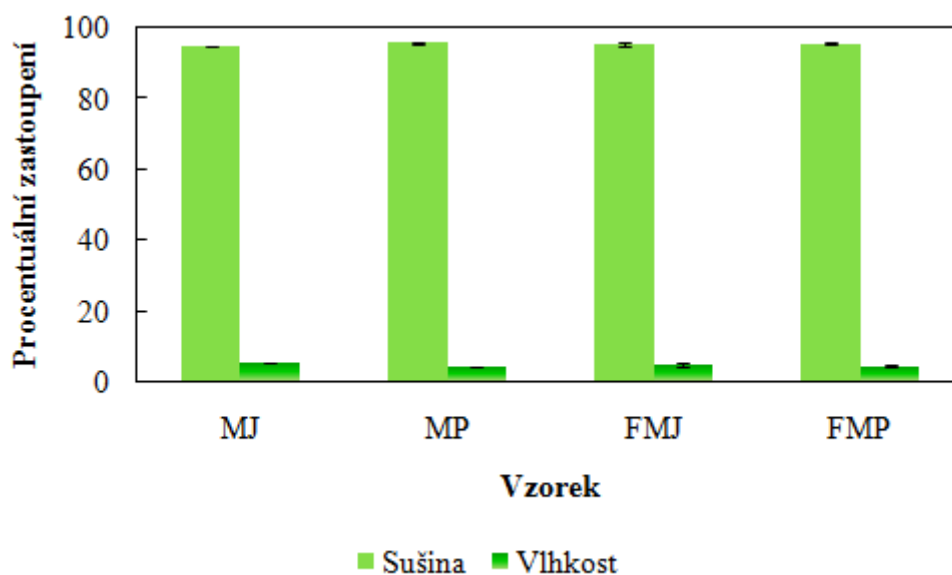
Sušina byla stanovena gravimetricky, dle postupu uvedeného v Kapitole 3.14, a to u vzorků meruňkových jader, pokrutiny, jader a pokrutiny po fermentaci. Z důvodu toho, že jsou na stanovení potřebné poměrně velké navážky, byla analýza provedena u každého vzorku pouze dvakrát. Následně byl z těchto hodnot vypočítán průměr a směrodatná odchylka pomocí programu Excel. Z obsahu sušiny v jednotlivých vzorcích byla stanovena také vlhkost materiálu. Ta byla vypočítána z rozdílu hmotnosti vzorku před vysušením a po vysušení a byla vyjádřena v hmotnostních procentech. Veškeré hodnoty nalezneme v Tabulka 22.

Tabulka 22: Obsah sušiny a vlhkosti v jednotlivých vzorcích

VZOREK	MJ	MP	FMJ	FMP
Sušina (%)	94,81 ± 0,06	95,51 ± 0,22	95,36 ± 0,52	95,78 ± 0,26
Vlhkost (%)	5,19 ± 0,06	4,49 ± 0,22	4,64 ± 0,52	4,22 ± 0,26

Deklarované hodnoty pro obsah vlhkosti v meruňkových jádrech se v odborné literatuře pohybuje v rozmezí (4–7,5) %. Standardní hodnoty pro množství sušiny jsou dány rozdílem 100% a hmotnostními procenty obsahu vlhkosti.

Z Tabulky 22 můžeme vyčíst, že v rozmezí deklarovaných hodnot se pohybují množství ve všech vzorcích. Ve vzorku MJ je toto množství 5,19 %, ve vzorku MP 4,49 %, ve fermentovaných jádrech pak 4,64 % a ve fermentované pokrutině 4,22 %. Nejvíce vlhkosti je tedy v meruňkových jádrech bez fermentace. Porovnání stanovených hodnot nalezneme také v Obr. 28. Z tabulky i grafu je patrné, že hodnoty množství sušiny po fermentaci jsou vyšší než před tímto procesem, což je pravděpodobně způsobeno zbytky mikroorganismů a celkovými zbytky procesu. Hodnoty vlhkosti souvisí i se stanovením obsahem lipidů (viz Kapitola 4.1). Jelikož byl nejmenší obsah lipidů u vzorku MJ, z pravidla musí být u tohoto vzorku největší množství vody. Při stanovení mohlo dojít k chybě způsobené neopatrným zacházením se vzorky mezi jednotlivými váženími. Hmotnost misek se vzorkem mohla vzrůstat vlivem oxidace vzdušným kyslíkem, což se nejčastěji stává u tuků a materiálů bohatých na tuk.



Obr. 28: Procentuální zastoupení sušiny a vlhkosti v jednotlivých vzorcích

#### 4.11 Vyhodnocení účinků krémů z meruňkového oleje

Krémy připravené z meruňkových olejů byly podrobeny měření hydratace a transepidermální ztráty vody, jehož postup nalezneme v Kapitole 2.4. Získané hodnoty hydratace a TEWLu pro každý krém byla vyhodnocena následovně: z hodnot pěti probandů byl vypočítán průměr, a to pro každý krém v daném čase. Na Obr. 29 a Obr. 30 můžeme pozorovat vodorovnou černou čáru, která znázorňuje průměr hodnot nulového času, tzn. měření pokožky po odmaštění pomocí SDS a před nanesením krémů. Tento průměr byl proveden ze všech proměřených míst u všech pěti probandů, jelikož narušení kožní bariéry bylo narušeno u všech stejně. Na základě tohoto

průměru byly srovnány a vyhodnoceny účinky připravených krémů. Z obrázků můžeme vidět, že nulová hodnota hydratace se pohybuje okolo 31, dle Tabulka 2 můžeme říct, že po odmaštění byla pokožka velmi suchá. Pro transepidermální ztrátu vody je tato hodnota okolo 32 g/h·m<sup>2</sup>, a z Tabulka 3 můžeme opět vyčíst, že tato hodnota označuje kritický stav pokožky.

### ***Hydratační účinky***

Jak již bylo zmíněno, měření hydratace probíhalo pomocí korneometru. Každé místo u každého z probandů bylo měřeno desetkrát a následně byl z těchto hodnot vypočítán průměr. Výsledný graf hydratačních účinků jednotlivých krémů v závislosti na čase, který můžeme vidět na Obr. 29, byl sestaven postupem, uvedeném v prvním odstavci této kapitoly.

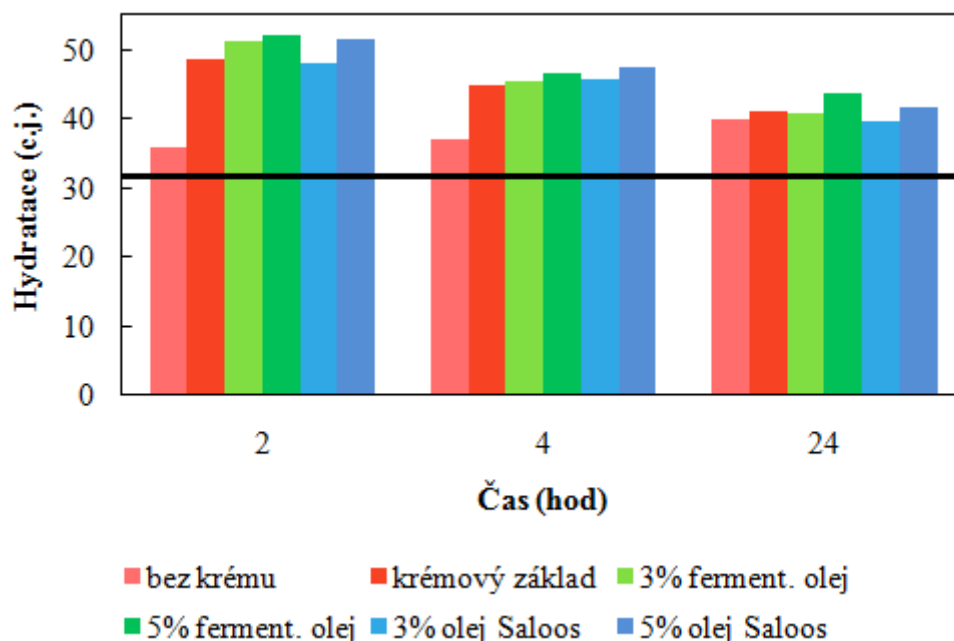
Z grafu je patrné, že po aplikaci krémů byla pokožka hydratovaná, a to i v místě bez aplikace krému. Pokožka se po narušení kožní bariéry-odmaštění pomocí SDS začala po čase sama postupně obnovovat. Hodnoty hydratace pro místo bez ošetření krému se pohybují zhruba v rozmezí 35–40. Z Tabulka 2 můžeme odvodit, že pokožka probandů měla suchý charakter. Plet' se tedy sama nestačila úplně hydratovat, a to ani po jednom dni od narušení kožního povrchu.

Krémový základ, bez přidaného oleje, sám o sobě plet' hydratoval a jeho hodnoty hydratace byly přibližně stejné jako pro 3% krém s fermentovaným olejem nebo s olejem značky Saloos. Nejvíce byla pokožka hydratovaná po 2 hodinách od aplikace krémového základu Cremor Basalis a jeho účinky se s časem postupně snižovaly. Porovnáním hodnot s Tabulka 2 můžeme říci, že plet' byla nejprve hydratovaná a postupem času nabývala opět suchý charakter.

Krém s vmíchaným fermentovaným olejem o celkové koncentraci 3 % nabýval přibližně stejných hodnot účinků hydratace jako stejný krém o celkové koncentraci 5 %. I když 5% krém nabýval lehce vyšších účinků, zejména po jednom dni od aplikace. Nicméně hodnoty u obou krémů klesaly v závislosti na čase. Pohledem do Tabulka 2 však zjistíme, že v obou případech byla plet' hydratovaná, a to po celou dobu měření.

Jak již bylo zmíněno výše, hodnoty hydratace u 3% krému s olejem značky Saloos byly poměrně stejné jako hodnoty po nanesení pouze krémového základu nebo u 3% krému s fermentovaným meruňkovým olejem. Po 2 hodinách od aplikace byla pokožka hydratovaná, postupně však svou hydrataci ztrácela a začínala mít suchý charakter (viz Tabulka 2).

Účinky hydratace 5 % krému s meruňkovým olejem značky Saloos byly po 2 i 4 hodinách od aplikace přibližně stejné jako u 5% krému s FMO. Po 24 hodinách od ošetření pokožky tyto hodnoty poměrně značně klesly. Plet' zůstala hydratovaná, i když pohledem do Tabulka 2 bychom mohli říct, že po 24 hodinách od ošetření začínala mít sušší charakter.



Obr. 29: Hydratační účinky připravených krémů v závislosti na čase

Měřením jsme potvrdili skutečnost, že meruňkový olej má výborné hydratační účinky, a proto je vhodný jako přísada právě do hydratačních pleťových krémů. Celkově byla pokožka nejvíce hydratovaná po 2 hodinách od aplikace a tyto účinky se postupně snižovaly, proto by se měly tyto krémy denně používat. Dle našeho měření má nejvyšší účinky hydratace fermentovaný olej v porovnání s meruňkovým olejem Saloos, což může souviset i se způsobem výroby těchto olejů. Může to být také způsobeno výsledky stanovení antioxidační aktivity u fermentovaných meruňkových jader, ze kterých je daný olej vyroben. Dle našich stanovení se ukázalo, že právě vzorky po fermentaci se vyznačují vyšší antioxidační aktivitou než vzorky bez fermentace. Také obsah antioxidačních látek, jako jsou polyfenoly, flavonoidy, ale i vitamíny C a E, je u vzorků po fermentaci vyšší než před tímto procesem. Může na to mít vliv také skladování těchto olejů, kdy patrně mohlo vzniknout možné znehodnocení. Meruňkový olej značky Saloos byl také použit až po ročním skladování u spotřebitele, tudíž se v něm mohly také odehrát různé procesy vedoucí k jeho znehodnocení.

### ***Transepidermální ztráta vody***

Měření transepidermální ztráty vody bylo provedeno sondou tewametru. Každé označené místo u každého z probandů bylo proměřeno celkem patnáctkrát. Pro větší přesnost byl aritmetický průměr počítán pouze z posledních deseti hodnot, kdy došlo k jejich ustálení. Data byla opět zpracována dle postupu, uvedeném v prvním odstavci této Kapitoly a jejich výsledný graf můžeme vidět na Obr. 30.

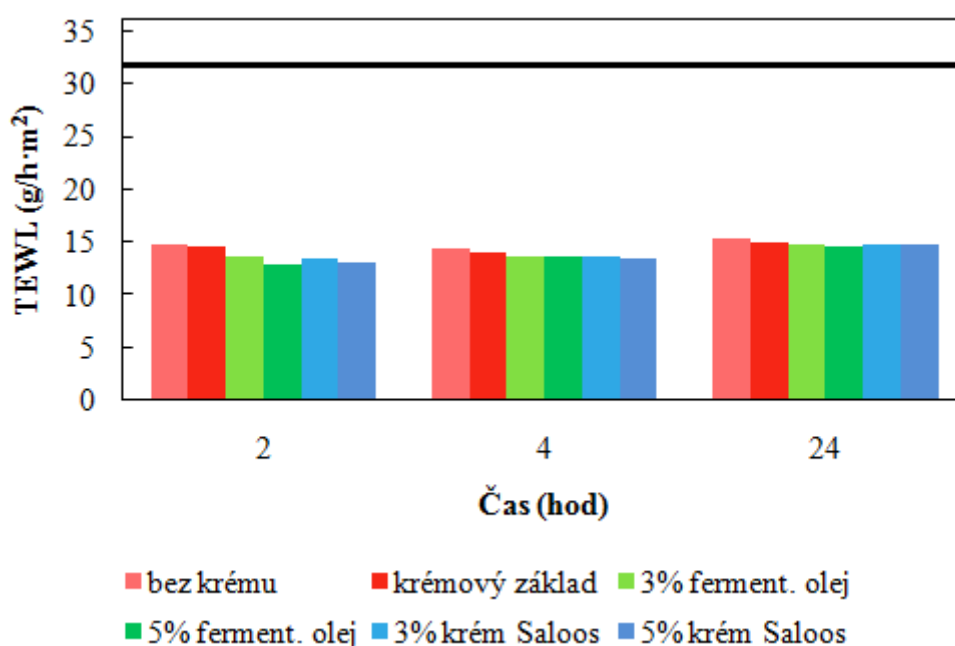
Z grafu můžeme vyčíst, že po podráždění pokožky docházelo k značným transepidermálním ztrátám vody a jak již bylo zmíněno, dle Tabulka 3 můžeme říci, že stav pokožky byl kritický. Regenerace kožní bariéry však probíhala poměrně rychle, po 2 hodinách od odmaštění, došlo k výraznému snížení hodnot, a to i na místě, na kterém nebyl krém aplikován. Pohledem do Tabulka 3 zjistíme, že se stav pokožky změnil z kritického na průměrný.

TEWL v místě aplikace krémového základu, Cremor Basalis, jehož složení můžeme vidět v Tabulka 9, nabývala prakticky stejných hodnot jako v místě bez krému. Stav pleti je tedy opět



průměrný, z čehož lze odvodit, že krémový základ slouží spíše k její hydrataci. Jak již bylo zmíněno v Kapitole 3.15, krémový základ je hydrofilním typem emulze (tzn. o/v), tudíž není schopen zajistit dostatečnou ochrannou vrstvu tak, aby se v pokožce zadržela voda.

Krém s vmíchaným FMO, který měl celkovou koncentraci 3 %, vykazoval přibližně stejné hodnoty jako 3% krém s olejem značky Saloos. Oba tyto krémy však měly větší schopnost zadržovat vodu než samotný krémový základ. Nejvíce bylo zabráněno úniku vody z pokožky po 2 hodinách od aplikace krémů. V závislosti na čase se hodnoty mírně zvýšily, ale i přesto měla pleť dobrý stav, což také dokazuje Tabulka 3. Podobně na tom byly i 5 krémy s fermentovaným meruňkovým olejem i s olejem Saloos. Ty také nabývaly přibližně stejných hodnot TEWL. Opět byl zaznamenán nejmenší úbytek transepidermální vody po 2 hodinách od ošetření. Po celou dobu měření se tyto hodnoty nijak výrazně nezměnily, po celou dobu měla pleť dobrý stav.

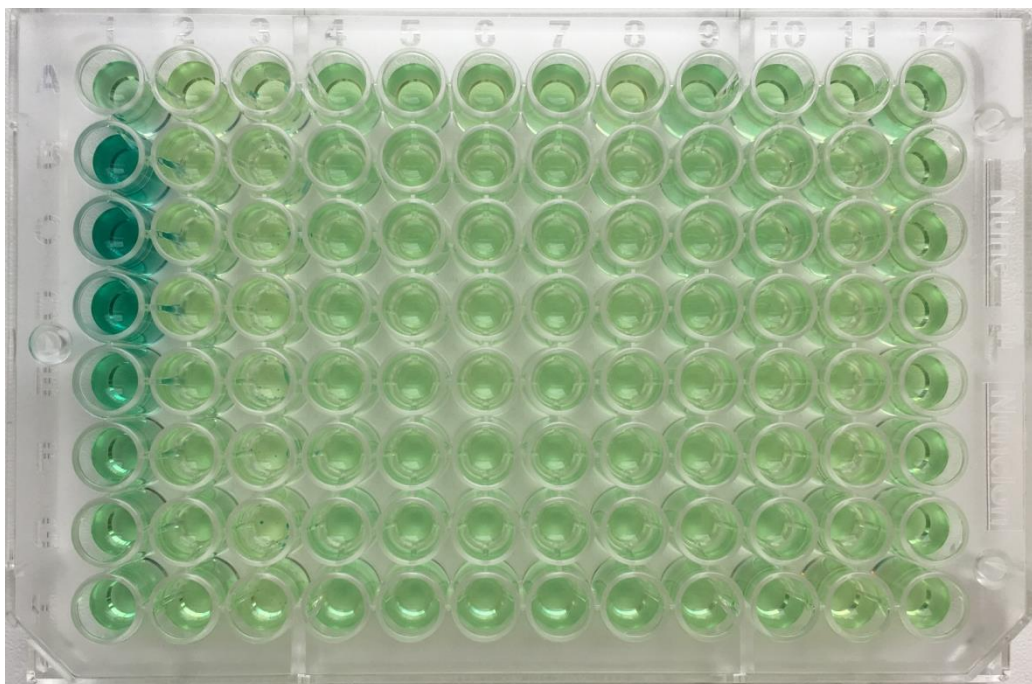


Obr. 30: Transepidermální ztráta vody v závislosti na čase

Obecně byla v místech ošetřených krémy s vmíchanými oleji pozorována větší schopnost zadržení vody v epidermis než v místech ošetřených pouze krémovým základem. Meruňkový olej má tedy vliv nejen na hydrataci pokožky, ale také na zadržování vody. Je to zejména díky množství lipidických látek, které jsou v něm obsaženy, a které tak nahrazují chybějící složky vlastního hydrolipidického filmu pokožky.

#### 4.12 SOS Chromotest

Jak již bylo zmíněno v Kapitole 3.16, testování proběhlo v rámci bakalářské práce Michaely Ručkové. Z naměřených hodnot byl pro každou zkušební koncentraci vypočten SOS indukční faktor (SOSIF). Na Obr. 31 můžeme vidět mikrotitrační destičku po ukončení SOS Chromotestu. První sloupec obsahuje pouze pozitivní kontrolu. Naše vzorky (MO a FMO), o různých koncentracích, se nachází ve třetím sloupci.



*Obr. 31: Mikrotitrační destička po ukončení SOS Chromotestu*

Z dosažených výsledků testování lze konstatovat, že oba typy olejů nejsou v koncentraci pod 5 % toxické, ani genotoxické. Jejich použití v kosmetických produktech, do zmíněné celkové koncentrace 5 %, je tedy zcela bezpečné.

## 5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo provést komplexní analýzu oleje z meruňkových jader, který se v dnešní době začal hojně používat především jako složka hydratačních krémů, ale své místo si našel také v potravinářském odvětví. Práce je zaměřena na charakterizaci čistého meruňkového oleje a také na charakterizaci tohoto oleje po fermentaci.

Za použití řady analytických metod, byla stanovena množství biologicky aktivních látek, které se v daném oleji nachází. Mezi nejdůležitější patří bezesporu mastné kyseliny, které hrají v meruňkovém oleji důležitou roli. Ve větším množství jsou zde zastoupeny, kyselina olejová a linolová, které patří do skupiny nenasycených mastných kyselin a mají příznivé účinky např. na kardiovaskulární systém. Dále je zde ve větším množství zastoupena kyselina palmitová, což je nasycená mastná kyselina, a právě s kyselinou linolovou, je zodpovědná za dobré roztírání a vstřebatelnost oleje do pokožky. Stanovení mastných kyselin bylo provedeno ihned po obdržení vzorků a následně po roce skladování. Námi stanovená množství sice neodpovídala deklarovaným hodnotám, nicméně ani po ročním skladování nedošlo k výrazným změnám ve složení mastných kyselin. Celkově se v meruňkovém oleji po fermentaci nachází větší množství nenasycených mastných kyselin než v oleji bez tohoto procesu, což bylo potvrzeno i stanovením jodového čísla.

Kromě mastných kyselin jsou velice důležitými složkami antioxidační látky, zejména vitamíny – kyselina askorbová a tokoferol, protože se jedná o esenciální skupinu látek, kterou je nutné přijímat z potravy. Oba tyto vitamíny hrají v lidském organismu klíčovou roli. Tokoferol zpomaluje proces stárnutí tím, že v lipidových dvojvrstvách vychytává volné radikály. Díky tomu předchází poškození membrán, a v konečném stádiu i možným onkologickým a kardiovaskulárním chorobám. Kyselina askorbová je mimo jiné důležitá právě pro regeneraci tokoferolu, čímž dochází k ochraně membrány. Množství tokoferolu bylo stanoveno, jak pro čistý meruňkový olej, tak pro olej po fermentaci. Deklarovaným hodnotám odpovídalo množství vitamínu E v meruňkovém oleji po fermentaci, u meruňkového oleje bez fermentace bylo toto množství výrazně nižší. To bylo pravděpodobně způsobeno už samotným procesem získávání oleje anebo nesprávným skladováním, při kterém nejspíš došlo k oxidaci tohoto vzorku. Kyselina askorbová byla rovněž detekovatelná pouze v meruňkových jádrech po fermentaci. Nedetekovatelné množství v ostatních vzorcích (jádrech a pokrutině) bylo s největší pravděpodobností ovlivněno nestabilitou této látky. Stanovením antioxidační aktivity i obsahu polyfenolů a flavonoidů, jakožto důležitých antioxidačních látek, bylo dokázáno, že vzorky po fermentaci obecně nabývají vyšších hodnot v této oblasti než vzorky, které nebyly tomuto procesu podrobeny.

Dále byl v meruňkových vzorcích stanoven obsah lipidů, sacharidů, proteinů a dalších nutričních látek. Ukázalo se, že největší množství lipidů se nachází ve fermentovaných jádrech. Obsah lipidů se, stejně jako obsah jiných látek, odvíjí od odrůdy meruňky a také od klimatických podmínek pěstování. Toto množství úzce souvisí také s obsahem vody v jednotlivých vzorcích, což bylo potvrzeno stanovením obsahu vlhkosti v jednotlivých vzorcích. Obsah vlhkosti byl tedy nejmenší právě u fermentovaných meruňkových jader. Množství sacharidů i bílkovin je nejmenší ve vzorcích po fermentaci. Během fermentace potřebují mikroorganismy právě sacharidy jako zdroj energie a bílkoviny jako zdroj dusíkatých látek, tudíž je v pořádku, že obsah těchto látek je po kvašení nižší.

Nakonec byly, za pomoci krémového základu Cremor Basalis, připraveny krémy s různým množstvím meruňkového oleje, aby byla otestována jejich účinnost hydratace a schopnost snížení transepidermální ztráty vody. Pro obě měření bylo vybráno 5 probandů ve věku 23–24 let s různým typem pleti. Měření hydratace bylo provedeno za účelem zkoumání zvýšení hydratace pokožky. V práci bylo potvrzeno, že krémy s vmíchaným meruňkovým olejem, jsou skutečně přínosné v udržení hydratované epidermis. Největší hydratace pleti bylo dosaženo po 2 hodinách od aplikace krému. Hodnoty se postupem času snižovaly, ale i po jednom dni od ošetření pokožky krémem byla hydratace větší než po provedeném podráždění a narušení kožní bariéry pomocí SDS. Krém s vmíchaným fermentovaným olejem a krém s meruňkovým olejem značky Saloos o celkové koncentraci 5 % měly z připravených krémů největší schopnost hydratace. Z toho by se dalo usoudit, že čím větší množství meruňkového oleje se v daném krému nachází, tím je jeho schopnost hydratace účinnější. Testováním genotoxicity daných olejů bylo dokázáno, že kosmetické přípravky koncentrací 5 % nejsou pro organismus toxické.

Po narušení kožní bariéry kůže docházelo ke značným transepidermálním ztrátám vody a stav pokožky byl dle naměřených hodnot kritický. Již po 2 hodinách od ošetření podrážděných míst, připravenými krémy, se tyto ztráty výrazně snížily. Tyto hodnoty se začaly postupem času mírně zvyšovat, ale i po 24 hodinách od aplikace, byly hodnoty TEWLu nižší než po odmaštění pleti. Nejlépe udržovaly vodu v epidermis krémy s vmíchanými meruňkovými oleji o celkové koncentraci 5 %, ať už se jednalo o meruňkový olej po fermentaci, tak olej značky Saloos.

V diplomové práci byly potvrzeny blahodárné účinky meruňkového oleje. Díky látkám, které olej obsahuje, je jistě vhodný pro použití v potravinářském i kosmetickém odvětví. Námi obdržené vzorky však mohly být lehce znehodnoceny skladováním, případně samotnou extrakcí z daných materiálů. Potvrdilo to i stanovené číslo kyselosti, které nabývalo, oproti deklarovaným hodnotám, vysokých čísel. Jak již bylo zmíněno, číslo kyselosti charakterizuje kvalitu oleje. Při měření hydratace a TEWLu, se dle dosažených výsledků ukázalo, že možné znehodnocení oleje nemělo vliv na jejich použití v kosmetice. Pro použití v potravinářství, k vnitřnímu užití, bychom konkrétně tyto oleje raději nedoporučili.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Meruňky. ŘÍHA, Jan. *České ovoce : Díl 4. Meruňky, broskve, srstky, rybíz, maliny a ostružiny*. 1. Praha: Ovocnický spolek pro království České, 1917, s. 11-15.
- [2] Apricot seed. *Encyklopedia.com* [online]. Chicago: The Gale Group, Inc., 2005 [cit. 2016-11-01]. Dostupné z: <http://www.encyclopedia.com/medicine/encyclopedias-almanacs-transcripts-and-maps/apricot-seed>
- [3] SENICA, Mateja, Franci STAMPAR, Robert VEBERIC a Maja MIKULIC-PETKOVSEK. Transition of phenolics and cyanogenic glycosides from apricot and cherry fruit kernels into liqueur. *Food Chemistry* [online]. 2016, 203, 483-490 [cit. 2016-11-01]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.02.110. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814616302801>
- [4] Scientific Classification of Apricot. *Compare fruits* [online]. New York: softUsvista Inc., 2015 [cit. 2016-11-01]. Dostupné z: <http://www.fruitvs.com/en/scientific-classification-of-apricot/model-17-5>
- [5] GUPTA, Anil a P.C.Sharma. Standardization of technology for extraction of wild apricot kernel oil at semi-pilot scale. *Biological Forum – An International Journal* [online]. Dr. Y S Parmar University of Horticulture and Forestry, Nauni, Solan, 2009, 1(1), 51-64 [cit. 2016-11-08]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/publication/268268643\\_Standardization\\_of\\_technology\\_for\\_extraction\\_of\\_wild\\_apricot\\_kernel\\_oil\\_at\\_semi-pilot\\_scale](https://www.researchgate.net/publication/268268643_Standardization_of_technology_for_extraction_of_wild_apricot_kernel_oil_at_semi-pilot_scale)
- [6] KATE, A.E., U.C. LOHANI, J.P. PANDEY, N.C. SHAHI a A. SARKAR. Traditional and mechanical method of the oil extraction from wild apricot kernel: a comparative study. *Research Journal of Chemical and Environmental Sciences* [online]. Academy for Environment and Life Sciences, INDIA, 2014, 2(2), 54-60 [cit. 2016-11-08]. ISSN 2321-1040. Dostupné z: <http://www.aelsindia.com/rjcesapril2014/8.pdf>
- [7] Abricotier. *Larousse: Encyclopédie* [online]. Francie: Languedoc-Roussillon, 2014 [cit. 2016-11-01]. Dostupné z: <http://www.larousse.fr/encyclopedia/divers/abricotier/17888>
- [8] LEE, Hyun-hee, Jeong-Hyun AHN, Ae-Ran KWON, Eun Sook LEE, Jin-Hwan KWAK a Yu-Hong MIN. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Apricot Seed. *Phytotherapy Research* [online]. 2014, 28(12), 1867-1872 [cit. 2016-11-01]. DOI: 10.1002/ptr.5219. ISSN 0951418x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.5219>
- [9] Lipids in pharmaceutical and cosmetic preparations. *Grasas y Aceites* [online]. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Spain, 2000, 51(2), 74-96 [cit. 2017-03-04]. Dostupné z: [https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/17554/file\\_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/17554/file_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- [10] *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012, s. 301-318. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [11] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2009. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-051-4.
- [12] KONCHOK, Targais, Stobdan TSERING, Ashish YADAV a Shashi Bala SINGH. Extraction of apricot kernel oil in cold desert Ladakh, India. *Indian Journal of Traditional Knowledge* [online]. 2011, 10(2), 304-306 [cit. 2016-11-13]. Dostupné z:

[https://www.researchgate.net/publication/232289549\\_Extraction\\_of\\_apricot\\_kernel\\_oil\\_in\\_cold\\_desert\\_Ladakh\\_India](https://www.researchgate.net/publication/232289549_Extraction_of_apricot_kernel_oil_in_cold_desert_Ladakh_India)

- [13] KUČEROVÁ, Jindřiška, Miloš PELIKÁN a Luděk HŘIVNA. *Zpracování a zbožiznalství rostlinných produktů*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN 978-80-7375-088-6
- [14] Lisování. KADLEC, Pavel, Karel MEIZOCH a Michal VOLDŘICH. *Procesy a zařízení v potravinářství a biotechnologiích*. Ostrava: Key Publishing, 2013, s. 176-187. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-163-4.
- [15] Lipidy. VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I.* 3. Tábor: OSSIS, 2009, s. 87-90. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [16] Tuky. HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001, s. 60-70. ISBN 80-86494-02-0.
- [17] ZHOU, Bo, Yan WANG, Jingjing KANG, Haiyan ZHONG a Paul D. PRENZLER. The quality and volatile-profile changes of Longwangmo apricot ( *Prunus armeniaca* L.) kernel oil prepared by different oil-producing processes. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2016, 118(2), 236-243 [cit. 2017-02-02]. DOI: 10.1002/ejlt.201400545. ISSN 14387697. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201400545>
- [18] GUPTA, Anil, PC SHARMA a Anil VERMA. Studies on physico-chemical characteristics and fatty acid composition of wild apricot (*Prunus armeniaca* Linn.) kernel oil. *Indian Journal of Natural Products and Resources* [online]. India: NISCAIR-CSIR, 2012, 3(3), 366-370 [cit. 2017-01-26]. ISSN 0976-0512. Dostupné z: <http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/14818/1/IJNPR%203%283%29%20366-370.pdf>
- [19] Oleic acid. *PubChem* [online]. USA: PubChem, 2012 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oleic\\_acid#section=Top](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/oleic_acid#section=Top)
- [20] Linoleic acid. *PubChem* [online]. USA: PubChem, 2011 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linoleic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linoleic_acid)
- [21] Palmitoic acid. *PubChem* [online]. USA: PubChem, 2014 [cit. 2017-01-26]. Dostupné z: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linoleic\\_acid](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/linoleic_acid)
- [22] Sacharidy. HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001, s. 48-59. ISBN 80-86494-02-0.
- [23] Sacharidy. VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, s. 207-245. ISBN 978-80-86659-17-6.
- [24] KURZ, Christina, Reinhold CARLE a Andreas SCHIEBER. Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chemistry* [online]. 2008, 106(1), 421-430 [cit. 2017-01-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.05.078. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814607005407>
- [25] Chemická analýza krmiv. *Fakulta veterinární hygieny a ekologie* [online]. Brno: Štercová, Straková, 2011 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: [https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvv/chemicka\\_analyza\\_krmiv/metodiky/chemickaanalyza.pdf](https://fvhe.vfu.cz/static/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvv/chemicka_analyza_krmiv/metodiky/chemickaanalyza.pdf)

- [26] Fiber. *HARVARD T.H.CHAN: The Nutrition Source* [online]. Boston: Harvard, 2013 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/carbohydrates/fiber/>
- [27] Bílkoviny. VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin*. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009, s. 35-37. ISBN 9788086659152.
- [28] Antioxidanty. VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I.* 3. Tábor: OSSIS, 2009, s. 183-190. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [29] PITERKOVÁ, Jana, Kateřina TOMÁNKOVÁ a Lenka LUHOVÁ. OXIDATIVNÍ STRES: LOKALIZACE TVORBY AKTIVNÍCH FOREM KYSLÍKU A JEJICH DEGRADACE V ROSTLINNÉM ORGANISMU. *Chemické listy* [online]. Olomouc, 2005, 99(99), 455-466 [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_07\\_455-466.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_07_455-466.pdf)
- [30] Antioxidanty vs. volné radikály. *Úvod do výživy* [online]. Brno: Masarykova univerzita, 2015 [cit. 2017-02-17]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/el/1411/podzim2015/BKUV011/Antioxidanty\\_vs\\_VR.pdf](https://is.muni.cz/el/1411/podzim2015/BKUV011/Antioxidanty_vs_VR.pdf)
- [31] Současné teorie stárnutí: Teorie volných radikálů. *Gerontologie* [online]. Hradec Králové: Farmaceutická fakulta UK, 2000 [cit. 2017-02-17]. Dostupné z: [http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/mechanisms/theory/theory\\_contemporary.asp](http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/mechanisms/theory/theory_contemporary.asp)
- [32] Vitamíny. VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I.* 3. Tábor: OSSIS, 2009, s. 371. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [33] Vitamín C. VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I.* 3. Tábor: OSSIS, 2009, s. 429-436. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [34] Vitamín E. VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ. *Chemie potravin I.* 3. Tábor: OSSIS, 2009, s. 387-395. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [35] Vitamíny. *Biotechnologie přírodních látek* [online]. Fakulta chemická, VUT Brno, 2017 [cit. 2017-02-06]. Dostupné z: <https://moodle.vutbr.cz/course/view.php?id=171876>
- [36] Phenolic compounds. *TutorVista.com* [online]. USA: Tutor company, 2014 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/phenolic-compounds.html>
- [37] Rostlinné fenolové látky a flavonoidy. *VŠCHT* [online]. Praha: Koplík, 2010 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplikr/Rostlinn%C3%A9%20fenoly%20a%20flavonoidy.pdf>
- [38] Flavonoids/polyphenols. *Faculdade de Ciencias da Universidade do Porto* [online]. Porto, 2012 [cit. 2017-02-23]. Dostupné z: <http://www.fc.up.pt/pessoas/lfguido/Design/Assets/Flavonoids.pdf>
- [39] Flavonoidy. VELÍŠEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002, s. 368. ISBN 80-86659-02-x.
- [40] Tuky. HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001, s. 60-70. ISBN 80-86494-02-0.
- [41] HRSTKA, Miroslav. *Praktikum z analytické chemie potravin*. 1. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2013.
- [42] Chromatografie. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. 10-26. ISBN 80-86369-07-2.
- [43] Sacharidy. *VŠCHT* [online]. Praha: Koplík, 2013 [cit. 2017-02-27]. Dostupné z: <https://web.vscht.cz/~koplikr/Sacharidy.pdf>

- [44] Stanovení obsahu neutrálních sacharidů podle Duboise. *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005, s. 139. ISBN 80-7080-586-2.
- [45] Bílkoviny. HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001, s. 36-47. ISBN 80-86494-02-0.
- [46] Voda, sušina a minerální látky. HÁLKOVÁ, Jana, Marie RUMÍŠKOVÁ a Jana RIEGLOVÁ. *Analýza potravin*. 2. vyd. Újezd u Brna: I. Straka, 2001, s. 23-35. ISBN 80-86494-02-0.
- [47] CORTAZÁR, Tania a Mauricio GUZMÁN-ALONSO. Water content at different skin depths and the influence of moisturizing formulations. *Household and Personal Care Today* [online]. Columbia, 2016, vol.11(1), 7 [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: [http://farmacosmetica2016.com/wp-content/uploads/2016/03/HPC1\\_2016\\_LOW\\_37-43-water-content-at-different-skin-depths-Enero-febrero-2016.pdf](http://farmacosmetica2016.com/wp-content/uploads/2016/03/HPC1_2016_LOW_37-43-water-content-at-different-skin-depths-Enero-febrero-2016.pdf)
- [48] LEYDEN, James J. a Anthony V. RAWLINGS. *Skin moisturization*. 1. New York: Marcel Dekker, c2002. Cosmetic science and technology series, v. 25. ISBN 08-247-0643-9.
- [49] Structure of the epidermis. In: *Theraworks technology* [online]. Asheville: Theraworx, 2012 [cit. 2017-03-05]. Dostupné z: <https://theraworx.com/theraworx-science/>
- [50] RESL, V., P. CETKOVSKÁ, M. LEBA a I. RAMPL. Měření hydratace kůže. *Česko-slovenská dermatologie* [online]. Praha, 2006, 81(5), 298-304 [cit. 2017-03-07]. Dostupné z: <http://www.prolekare.cz/cesko-slovenska-dermatologie-clanek/mereni-hydratace-kuze-5121>
- [51] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-731-8016-2.
- [52] FLUHR, Joachim. *Bioengineering of the skin: water and stratum corneum*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2005. Dermatology (CRC Press). ISBN 08-493-1443-7.
- [53] Tewametr. In: *MICROCAYA* [online]. Bilbao, 2015 [cit. 2017-03-08]. Dostupné z: <http://www.microcaya.com/productos/analizadores-de-piel/para-investigacion/19-tewameter-tm-300>
- [54] LANGMAIER, Ferdinand. *Základy kosmetických výrob*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2001. Učební texty vysokých škol. ISBN 80-731-8016-2.
- [55] Testy genotoxicity. *Masarykova univerzita* [online]. Brno: Muni, 2006 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2006/Bi8635/GenEkotox-05-07-Predn6.pdf>
- [56] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia, 2008. ISBN 978-802-0017-031.
- [57] SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in Escherichia coli K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. USA, 1982, 79(2), 5971-5975 [cit. 2017-04-22]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC347033/pdf/pnas00458-0221.pdf>
- [58] Apricot kernel oil: Characterization, chemical composition and utilization in some baked products. *FOOD CHEMISTRY* [online]. 1986, 19(4), 287-298 [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030881468690052X/pdf?md5=b34f0868e0ac046c9cd8a1757c245303&pid=1-s2.0-030881468690052X-main.pdf>

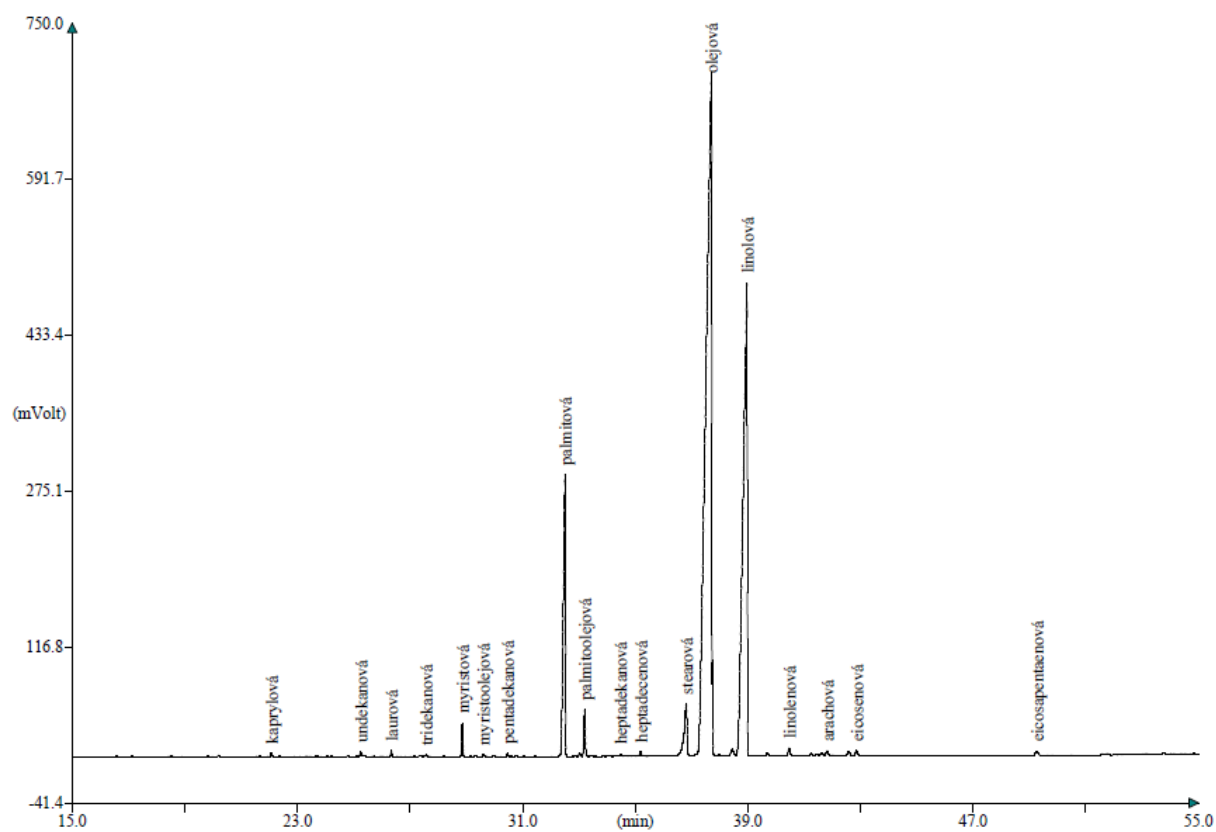


- [59] PAULOVÁ, Hana, Hana BOCHOŘÁKOVÁ a Eva TÁBORSKÁ. METODY STANOVENÍ ANTIOXIDAČNÍ AKTIVITY PŘÍRODNÍCH LÁTEK IN VITRO. *Chemické listy* [online]. 2004, 98(3), 174-179 [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004\\_04\\_03.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_04_03.pdf)
- [60] MAVI, A. a N. YIGIT. Antioxidant and antimicrobial activities of bitter and sweet apricot (*Prunus armeniaca* L.) kernels. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* [online]. Brazilia, 2009, 42(4), 346-352 [cit. 2017-03-13]. ISSN 0100-879X. Dostupné z: <http://www.scielo.br/pdf/bjmr/v42n4/7321.pdf>
- [61] SAMSONOWICZ, Mariola a Ewa REGULSKA. Spectroscopic study of molecular structure, antioxidant activity and biological effects of metal hydroxyflavonol complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* [online]. 2017, 173, 757-771 [cit. 2017-03-13]. DOI: 10.1016/j.saa.2016.10.031. ISSN 13861425. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386142516306163>
- [62] FONTANNAZ, Patric, Tamara KILINÇ a Olivier HEUDI. HPLC-UV determination of total vitamin C in a wide range of fortified food products. *Food Chemistry* [online]. 2006, 94(4), 626-631 [cit. 2017-03-14]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.02.012. ISSN 03088146. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605001408>
- [63] Statistical Analysis and Quantification of Alpha Tocopherol in Edible Seeds and Nuts of Pakistan by Reversed Phase HPLC with UV/Visible Detector. *Journal- Chemical Society of Pakistan* [online]. 2012, 34(2), 302-305 [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Rabia\\_Rehman/publication/232041816\\_Statistical\\_Analysis\\_and\\_Quantification\\_of\\_Alpha\\_Tocopherol\\_in\\_Edible\\_Seeds\\_and\\_Nuts\\_of\\_Pakistan\\_by\\_Reversed\\_Phase\\_HPLC\\_with\\_UVVisible\\_Detector/links/09e4150739ea13f6d3000000/Statistical-Analysis-and-Quantification-of-Alpha-Tocopherol-in-Edible-Seeds-and-Nuts-of-Pakistan-by-Reversed-Phase-HPLC-with-UV-Visible-Detector.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Rabia_Rehman/publication/232041816_Statistical_Analysis_and_Quantification_of_Alpha_Tocopherol_in_Edible_Seeds_and_Nuts_of_Pakistan_by_Reversed_Phase_HPLC_with_UVVisible_Detector/links/09e4150739ea13f6d3000000/Statistical-Analysis-and-Quantification-of-Alpha-Tocopherol-in-Edible-Seeds-and-Nuts-of-Pakistan-by-Reversed-Phase-HPLC-with-UV-Visible-Detector.pdf)
- [64] Basiscreme DAC v dermatologické receptuře. *Dermatologie pro praxi* [online]. Doksy, 2015, 9(4), 174-177 [cit. 2017-03-29]. Dostupné z: <http://www.dermatologiepropraxi.cz/pdfs/der/2015/04/08.pdf>
- [65] AZCAN, NEZIHE a ELIF DEMIREL. Extraction Parameters and Analysis of Apricot Kernel Oil. *Asian Journal of Chemistry* [online]. 2012, 24(4), 1499-1502 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1513312231?pq-origsite=gscholar>
- [66] KAYA, CEMAL, OSMAN KOLA a ALI ALTAN. Some Characteristics and Fatty Acids Composition of Wild Apricot (*Prunus pseudoarmeniaca* L.) Kernel Oil. *Asian Journal of Chemistry* [online]. 2008, 20(4), 2597-2602 [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: [http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=20\\_4\\_18](http://www.asianjournalofchemistry.co.in/User/ViewFreeArticle.aspx?ArticleID=20_4_18)
- [67] ZHOU, Bo, Yan WANG, Jingjing KANG, Haiyan ZHONG a Paul D. PRENZLER. The quality and volatile-profile changes of Longwangmo apricot ( *Prunus armeniaca* L.) kernel oil prepared by different oil-producing processes. *European Journal of Lipid Science and Technology* [online]. 2016, 118(2), 236-243 [cit. 2017-03-20]. DOI: 10.1002/ejlt.201400545. ISSN 14387697. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201400545>

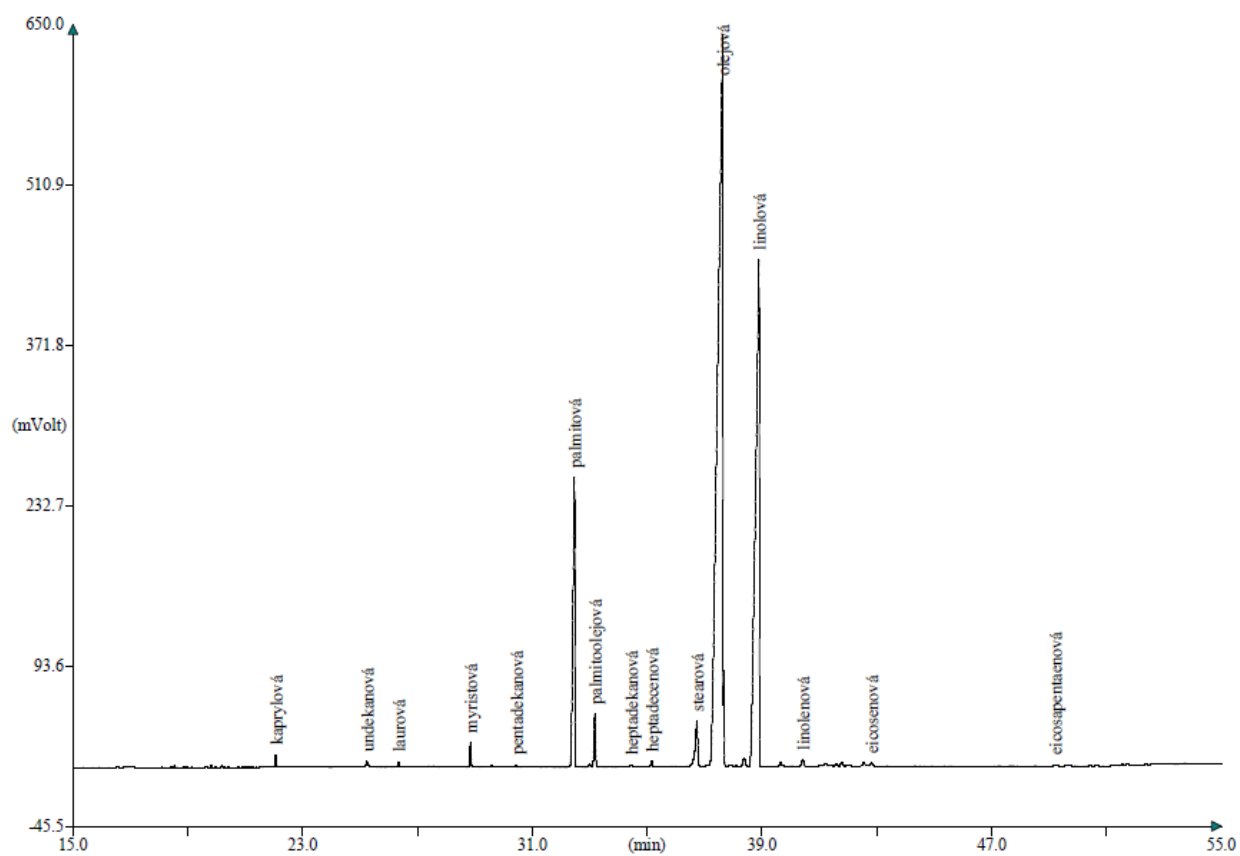
## 7 SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

nl	našeho letopočtu
HCN	kyanovodík
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	thiosíran sodný
NaOH	hydroxid sodný
KOH	hydroxid draselný
KI	jodid draselný
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	kyselina sírová
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	uhličitan sodný
NaNO <sub>2</sub>	dusitan sodný
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
GC-FID	plynová chromatografie s plamenovou ionizační detekcí
UV-VIS	záření v ultrafialové – viditelné oblasti spektra
MK	mastné kyseliny
MJ	meruňková jádra
MP	meruňková pokrutina
FMJ	fermentovaná meruňková jádra
FMP	fermentovaná meruňková pokrutina

## 8 PŘÍLOHY



*Příloha 1: Profil mastných kyselin oleje z meruňkových jader*



*Příloha 2: Profil mastných kyselin meruňkového oleje po fermentaci*